

**Induktion der Na-K-ATPase in den Plasmamembranen
der „funktionell hypertrophierenden“ Cäcummucosa
der Ratte:
Spezifische Aktivität und Kinetik**

Helmut Schiffel

1976

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Induktion der Na-K-ATPase in den Plasmamembranen
der "funktionell hypertrophierenden" Cäcummucosa
der Ratte: Spezifische Aktivität und Kinetik.



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Schiffel

aus

Landshut

München

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Loeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 4. 1976

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A <u>Einleitung</u>	3
B <u>Methodik</u>	
Tiermaterial und -haltung	9
Präparation der Mucosa	9
Homogenisation und Differential-Zentrifugation	10
Bestimmung der Adenosintriphosphatase-Aktivität	19
Proteinbestimmung: Phenol - Folin - Methode	26
Statistische Auswertung	30
C <u>Ergebnisse</u>	
I. Beobachtungen am Gesamttier	31
II. Makroskopische Beobachtungen am Cäcum	33
III. Feuchtgewicht und Proteingehalt der Mucosa	33
IV. Na-K-ATPase	37
V. Mg-ATPase	45
VI. Relative spezifische Aktivität der ATPasen	50
VII. Bestimmung der Na-K-ATPase in Epithelzellen	52
VIII. Eigenschaften der Na-K-ATPase	53
D <u>Diskussion</u>	
Zunahme der Cäcummasse	68

	Seite
Steigerung des Natriumtransports während der Hypertrophie	69
Zunahme der Na-K-ATPase während der Hypertrophie	71
Zeitliche Korrelation zwischen Na-K-ATPase und Natrium-Nettoresorption während der Hypertrophie	73
Mechanismus der Aktivitätssteigerung der Na-K-ATPase	74
Analogien zur funktionellen Hypertrophie anderer elektrolyttransportierender Epithelien	78
Steuerung des Adaptationsprozesses	81
E <u>Zusammenfassung</u>	84
F <u>Literaturverzeichnis</u>	87

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Einleitung

Zur Grundausrüstung der animalischen Zellen gehören nicht zuletzt auch ihre hoch spezialisierten und differenzierten Plasmamembranen, die den Zelleib umgeben und die meisten der Zellorganellen aufbauen. Die wichtigste und allgemeinste Funktion dieser biologischen Membranen ist die Einschränkung des Stoffaustausches zwischen den verschiedenen Kompartimenten, deren konstante Zusammensetzung für die funktionelle Integrität der Zelle von entscheidender Bedeutung ist. Als Grenzbarriere zwischen den definierten Haupträumen Extracellulär- Raum, Zytoplasma und mitochondrialer Matrix verfügen sie über selektive Permeabilitäten und spezielle Transportmechanismen, so daß sie einerseits den spontanen Übertritt bestimmter Stoffe hochgradig hemmen, andererseits durch passive und aktive Transportphänomene die Impermeabilität überbrücken und den Durchtritt der Substanzen entsprechend den Erfordernissen des Stoffwechsels dosieren und Änderungen der Umgebung in adäquater Weise beantworten können.

Ein neuer Abschnitt in der Frage über den Mechanismus des aktiven Transportes wurde eingeleitet durch die Entdeckung von ATP-spaltenden Enzymen, die durch Mg, Na und K aktiviert werden und bei aktiven Transporten von Na und K an Zellgrenzflächen beteiligt sind (111,112). Inzwischen liegen über die enge Verknüpfung dieser Ionentransporte mit der Na- K- stimu-

lierten ATP-ase zahlreiche Befunde vor, die vermuten lassen, daß das Enzym neben seiner energieliefernden Aufgabe gleichzeitig als Carrier-Molekül für Natrium- und Kaliumionen dient. Beide Systeme, die Na-K-ATPase und das Na-K-Transportsystem sind an die basolaterale Zellmembran gebunden (21,35,46,61,86,104,119); die Affinität zu Na und K ist für Enzym und Transport weitgehend identisch (23,83). Die Na-K-ATPase ist in charakteristischer Weise durch Ouabain (g-Strophanthin) hemmbar und zwar im gleichen Konzentrationsbereich wie der Na-K-Transport durch die Membran (128). Schließlich entsprechen sich ihre Temperaturkoeffizienten und molare Aktivierungsenergie (4). Diese Identität ermöglichte, daß man, um den Mechanismus des aktiven Transportes zu studieren, die Untersuchungen an Membranfragmenten vornehmen kann, die mit der Na-K-ATPase das dafür verantwortliche Enzymsystem enthalten (47).

Zu betonen ist jedoch, daß man noch heute über kein Carrier-Modell verfügt, das sämtliche experimentellen Befunde zufriedenstellend erklären kann. Unter den zahlreichen Modellvorstellungen (1,7,18,36,84,103,118,127,134) ist die von Repke und Schön (89-91,102) entwickelte hervorzuheben, weil sie mit den bisher gemessenen Parametern der Na-K-ATPase besonders gut übereinstimmt. Das Enzymsystem besteht demnach aus zwei Untereinheiten, die durch gegenseitige Konformationsänderungen den zeitgleichen Transport der Na- und

Kaliumionen durch einen sog. Flip- Flop- Mechanismus ermöglichen. Das Enzymmolekül soll für beide Ionen sensitive Zentren besitzen, deren Affinität auf der Innenseite der Zellmembran für Natrium größer als für Kalium ist, während auf der Außenseite eine größere Affinität für Kalium bestehen soll. Im ersten Reaktionsschritt binden Peptid- oder Polyanionenketten mit SH-, Amino- sowie Carboxylgruppen in Gegenwart von Magnesium (zur Bildung eines Mg-ATP-Komplexes) und Natriumionen als reaktive Gruppen die terminale Phosphatgruppe des ATP, so daß zunächst ein energiereicher Intermediärkomplex gebildet wird, der zur Konfigurationsänderung des Enzymmoleküls führen soll. Damit würden die zum Zellinneren gerichteten natriumsensitiven Zentren zur Außenseite der Zellmembran rotieren. Die nach Abgabe von Natrium nun größere Affinität des Enzymmoleküls zu Kalium führt zur Anlagerung der Kaliumionen. Im zweiten Reaktionsschritt - aktiviert durch K und hemmbar durch Ouabain - wird der Intermediärkomplex dephosphoryliert, wonach das Enzymmolekül nach Verlust der energiereichen Phosphatbindung in seine Ausgangskonfiguration zurückkehrt.

Die Na-K-ATPase wurde in allen Geweben gefunden, insbesondere aber in solchen, die einen epithelialen Aufbau zeigen. Zwischen der speziellen Funktion der einzelnen Gewebe und der Aktivität des Enzymsystems ist ein quantitativer Zusammenhang insofern zu beobachten, als die elektrisch stimulier-

baren (Nervengewebe, Herzmuskel), sezernierenden sowie die mit der Absorption von Elektrolyten befassten Gewebe (Niere, Darmepithel) hohe spezifische Aktivitäten der Na-K-ATPase enthalten (12,13,43,58,125).

Da die Hauptaufgabe biologischer Membranen im Stoffaustausch mit der äußeren und inneren Umgebung besteht, müssen die Membranen auf Milieuänderungen reagieren können. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn viele Membranen Adaptationsphänomene aufweisen. Dabei nehmen die Epithelien des Magen-Darm-Kanals insofern eine Sonderstellung ein, als sie erheblichen Änderungen des externen, von der zugeführten Nahrung abhängigen Milieus ausgesetzt sind. Seit einigen Jahren ist prinzipiell auch bekannt, daß sich die Darmschleimhaut veränderten Umweltbedingungen durch Variation ihrer Masse (2,22,38,81,110,122) oder der digestiv- resorptiven Funktion ihrer Einzelzellen (10,20,24,80,98) anzupassen vermag. Dennoch liegen am Warmblüter erstaunlich wenig detaillierte Befunde über Ausmaß und Pathophysiologie intestinaler Adaptationen vor. Speziell sprachen bisher nur vereinzelte Beobachtungen dafür, daß die Transportfunktion für Elektrolyte und Wasser am Warmblüterdarm adaptativ modifizierbar ist (8,9,107,121).

Ein Darmabschnitt, für den sowohl eine Massenreaktion als auch eine funktionelle Adaptation des Elektrolyttransports

bereits gesichert sind, ist das Cäcum der Ratte. Es wurde nämlich beobachtet, daß der Zusatz des nicht resorbierbaren Polymers Polyäthylenglykol 4000 zum Trinkwasser erwachsener Ratten ein echtes Organwachstum ("Hypertrophie") induzierte, ferner eine Stimulierung der Nettoresorption von NaCl und Wasser pro Gewebseinheit, sowie schließlich eine Aktivitätserhöhung der Na-K-ATPase im Schleimhauthomogenat (68,69). Die Steigerung des Natriumnettotransportes ging höchstwahrscheinlich auf eine Stimulierung der aktiven Komponente des Natriumtransportes zurück (70). Da gleichzeitige Änderungen der Chloridresorption sowie der Bicarbonatsekretion sehr viel geringer gefunden wurden als die Steigerung des Transports von Natrium (70), kam es im Zuge der Hypertrophie offenbar zu einer mehr oder weniger selektiven Stimulierung der Resorption von Natrium und, da diese die treibende Kraft für die Wasserresorption darstellt, auch von Wasser.

Dieses experimentell handliche Modell eines diätetisch induzierbaren Adaptationsprozesses erschien uns geeignet, detailliertere Daten über die induktiven Veränderungen der Na-K-ATPase zu gewinnen. So interessierte zunächst, ob eine zeitliche Korrelation zwischen der Steigerung der Natriumresorption und der Zunahme der Enzymaktivität besteht, da eine solche zeitliche Parallelität ein neues starkes Indiz für einen direkten Zusammenhang zwischen diesen beiden

Parametern wäre. Die Steigerung des Natriumtransportes war bereits nach 2 Tagen signifikant und erreichte nach 7 - 14-tägiger Fütterungsdauer ein Maximum, das während der Fütterungsperiode dann beibehalten wurde - in der beschriebenen Versuchsserie 2 Monate (69). Die bisherigen Messungen der Na-K-ATPase Aktivität waren aber lediglich nach ca. 10-tägiger Exposition durchgeführt worden (69). Zudem waren sie am Gesamthomogenat der Mucosa erfolgt, das eine relativ niedrige spezifische Aktivität der Na-K-ATPase aufweist. Unsere jetzigen Untersuchungen wurden daher an einer plasmamembranreichen Fraktion durchgeführt, welche hohe spezifische Aktivitäten aufwies. Zum anderen sollte der Mechanismus der Aktivitätssteigerung weiter abgeklärt werden. Für eine höhere spezifische Aktivität der Na-K-ATPase in der hypertrophierenden Mucosa kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht: So könnte sie durch eine Modifikation der Eigenschaften des Enzymmoleküls mit geänderter Kinetik zustande kommen, aber auch durch eine größere Molekülzahl pro Zellmasse hervorgerufen sein. Enzymkinetische Untersuchungen mit der mikrosomalen Fraktion sollten daher zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

Methodik

1. Tiermaterial und -haltung

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten des Stammes TNO W 70 (Fa. Winkelmann, Kirchborchen) durchgeführt. Nach Erhalt von der Lieferfirma wurden die Tiere zunächst eine Woche oder länger unter den Bedingungen unseres Tierstalles gehalten und hatten stets freien Zugang zu Standardpressfutter (Altromin R Altrogge, Lage) und Leitungswasser. Mit Versuchsbeginn wurde der Trinkflüssigkeit der experimentellen Gruppe (=PÄG-Gruppe) das leicht lösliche Polyäthylenglykol 4000 (MG 3000-3700, Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 160 g/l über den Zeitraum von 2 - 56 Tagen zugesetzt. Die Gefrierpunktserniedrigung dieser Lösung entsprach einer Osmolalität von 300 mOsm/kg. Der andere Teil der Tiere (=Kontrolltiere) nahm weiterhin Leitungswasser zu sich. Futter- und Flüssigkeitsaufnahme erfolgten nach wie vor ad libitum.

2. Präparation der Mucosa

Nach Abschluß der jeweiligen Fütterungsperiode wurden die 180 - 280 g schweren Tiere mit Äther narkotisiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Präparation immer zur gleichen Tageszeit erfolgte, um eventuelle tageszeitliche Schwankun-

gen der Aktivität der ATPasen (6) auf ein Minimum zu reduzieren.

Durch einen medianen Längsschnitt wurde sodann die Bauchhöhle eröffnet und das Cäcum hervorgeholt, vom Mesocäcum freipräpariert und am Übergang zu terminalem Ileum und Colon ascendens abgetragen. Das excidierte und entleerte Cäcum wurde mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, auf Filterpapier abgetupft und mittels zweier Pinzetten so auf Filterpapier ausgebreitet, daß die Mucosa nach oben und die Serosa nach unten faltenlos zu liegen kam. Die Mucosa wurde mit dem scharfen Rand eines Deckgläschen so vollständig wie möglich abgeschabt, gewogen (sog. Feuchtgewicht), in Homogenisationsgefäße mit Isolationsmedium übergeführt und dort bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung, die nach kurzer Zeit erfolgte, im Kühlraum aufbewahrt.

3. Homogenisation und Differential-Zentrifugation

3.1 Vorbemerkung

Einen groben Einblick in das intracelluläre Ortsmuster von Enzymen liefert die Zellfraktionierung, d.h. die Auftrennung von Zellen in ihre Bestandteile nach vorausgegangener vollständiger Desintegration des morphologischen Ordnungsgefüges. Mit dieser Methode lassen sich strukturspezifische Enzyme, sog. Leitenzyme, bestimmten subzellulären Strukturen zuordnen, während die aus dem Gesamthomogenat extrahierten Enzym-

aktivitäten lediglich eine summarische Auskunft über das Stoffwechselgeschehen im gesamten Gewebe geben. Die Na-K-ATPasen werden als am Na- und K- Transport beteiligte "marker-Enzyme" der baso-lateralen Plasmamembran angesehen, so daß gereinigte Plasmamembranfraktionen diese ATPasen in hohen spezifischen Aktivitäten enthalten (55).

Um verschiedene zelluläre Membranen zu isolieren, muß auf jeden Fall die Zellmembran zerstört werden; dabei sollten aber nach Möglichkeit Kerne, Mitochondrien und Lysosomen unbeschädigt erhalten bleiben. Dies nicht nur, um zu vermeiden, daß sich die Membranen dieser Organellen miteinander vermischen, sondern auch um zu verhindern, daß sich ihr Inhalt an andere Membranen adsorbiert bzw. diese aggregiert oder abbaut.

Die physikalische Technik zum Zellaufschluß im wäßrigen Milieu (sog. feuchtes Homogenat) beruht auf der Verzerrung angreifbarer Membransysteme durch äußere zwischen Flüssigkeit und Zelloberfläche auftretende Scherkräfte. Das Ausmaß der Fragmentierung hängt von der Größe der Scherkraft, der Geschwindigkeit ihrer Änderung, sowie von den viskoelastischen Eigenschaften der Zellmembran ab. Allgemein kritische Faktoren beim Zellaufschluß sind die Ionenkonzentrationen und die osmotischen Verhältnisse der verwendeten Medien. Die Herstellung homogener Zellsuspensionen ist somit nach wie vor problematisch. Hauptschwierigkeit ist die

Gefahr der Membranschädigung während der gewöhnlich langen Isolierungsschritte.

Von den zahlreichen mechanischen, akustischen, thermischen oder biologisch-enzymatischen Verfahren, Zellen im wäßrigen Milieu aufzuschliessen, ist der mechanische Aufschluß mittels der Pistill-Homogenisation nach Potter-Elvehjem die gebräuchlichste, die sich auch für Plasmamembranpräparationen bewährt hat. Ein straff sitzendes Pistill aus Teflon wird in einem dickwandigen Kolben mit einem Rührmotor rasch gedreht, das rotierende Pistill mit der Hand gegen den Kolben dabei auf und ab-geführt. Die im kapillaren Spalt zwischen Pistill und Zylinder auftretenden Scherkräfte zerstören die Zellmembran so schonend, daß die subzellulären Partikel unversehrt freigesetzt werden. Die Pistill-Homogenisation dient somit der Vorbereitung des Gewebes zur weiteren Auftrennung in die subzellulären Fraktionen. Ein Verfahren, das sich besonders zur Trennung subzellulärer Strukturen eignet, die sich in ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit unterscheiden, besteht in der Technik der Differentialzentrifugation (alternierende Anwendung von niedrigen und hohen Umdrehungszahlen). Die Trennung erfolgt nach Größe, Form und Dichte der Partikel, das Trennungsergebnis hängt zudem von der Zentrifugalkraft, sowie der Dichte und Viskosität des verwendeten Mediums ab. Isotone Rohrzuckerlösung eignet sich als Isolationsmedium, da es für die Zelle ein indifferentes Medium darzustellen scheint.

3.2 Durchführung

a) Gesamthomogenat

Die Mucosa wurde mit einer Schere in erbsengroße Stücke zerschnitten und mit dem straff sitzenden Teflon-Pistill im Potter Elvehjem - Homogenisator durch 3 x 5 Schläge bei 1500 Umdrehungen/Minute homogenisiert (Homogenisator S, Fa. Braun - Melsungen). Das verwendete Isolationsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

250 mM/l Saccharose
10 mM/l Triäthanolamin - HCl
5 mM/l Äthylendiamintetraacetat
pH 7.45 bei 20° C

Das Verhältnis zwischen Puffer und Mucosa betrug 20 : 1; die optimale Homogenisationsstärke wurde in Vorversuchen ermittelt, bei denen die Zahl der Schläge und die Umdrehungszahl des Geräts so lange variiert wurden, bis in einer bestimmten Probenmenge Mucosagewebe die Aktivität der ATPasen und der Proteingehalt der subzellulären Fraktionen konstant blieb. Sie gewährleisteten eine gleichmäßige Zermahlung des Gewebes und die schonende Aufschließung der Zellen. Die so erhaltene Suspension, eine wahllose Vermischung von Elementen, die in intakten Geweben oder in der Zelle räumlich voneinander getrennt sind, wurde als Gesamthomogenat bezeichnet.

b) Kernfraktion

Nichtaufgeschlossene Mucosazellen, größere Zellfragmente und die Zellkerne wurden von der Suspension durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1000 x g (MSE, High Speed 18) als lockeres Sediment abgetrennt. Der trübe Überstand wurde vorsichtig in andere Zentrifugenbecher übergelassen und erneut 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand dieser 2. Zentrifugation wurde für den nachfolgenden Schritt vorsichtig abgesaugt, die beiden Sedimente vereinigt und in Isolationsmedium mit 5 Schlägen bei 500 Umdrehungen/Minute vorsichtig resuspendiert. Abb. 1 zeigt eine elektronenoptische Aufnahme dieser sog. Kernfraktion.

c) Mitochondriale Fraktion

Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 9000 x g (MSE, High Speed 18) wurden die Mitochondrien als festes gelbes Sediment gewonnen. Der Überstand wurde in andere Zentrifugenbecher abgesaugt, die Mitochondrien in Isolationsmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Abb. 2 zeigt eine elektronenoptische Aufnahme des mitochondrialen Sedimentes.

d) Mikrosomale Fraktion

Im Schwerfeld der Ultrazentrifuge trennte sich nach 90 Minuten bei 105 000 x g (Spinco L₂ 65B, Fa. Beckman) ein festes braungelbes Sediment ab, das elektronenmikroskopisch als eine Vielzahl kleiner Vesikel und elektronenoptisch dichter Partikel imponierte (Abb. 3). Gemäß der ursprüng-

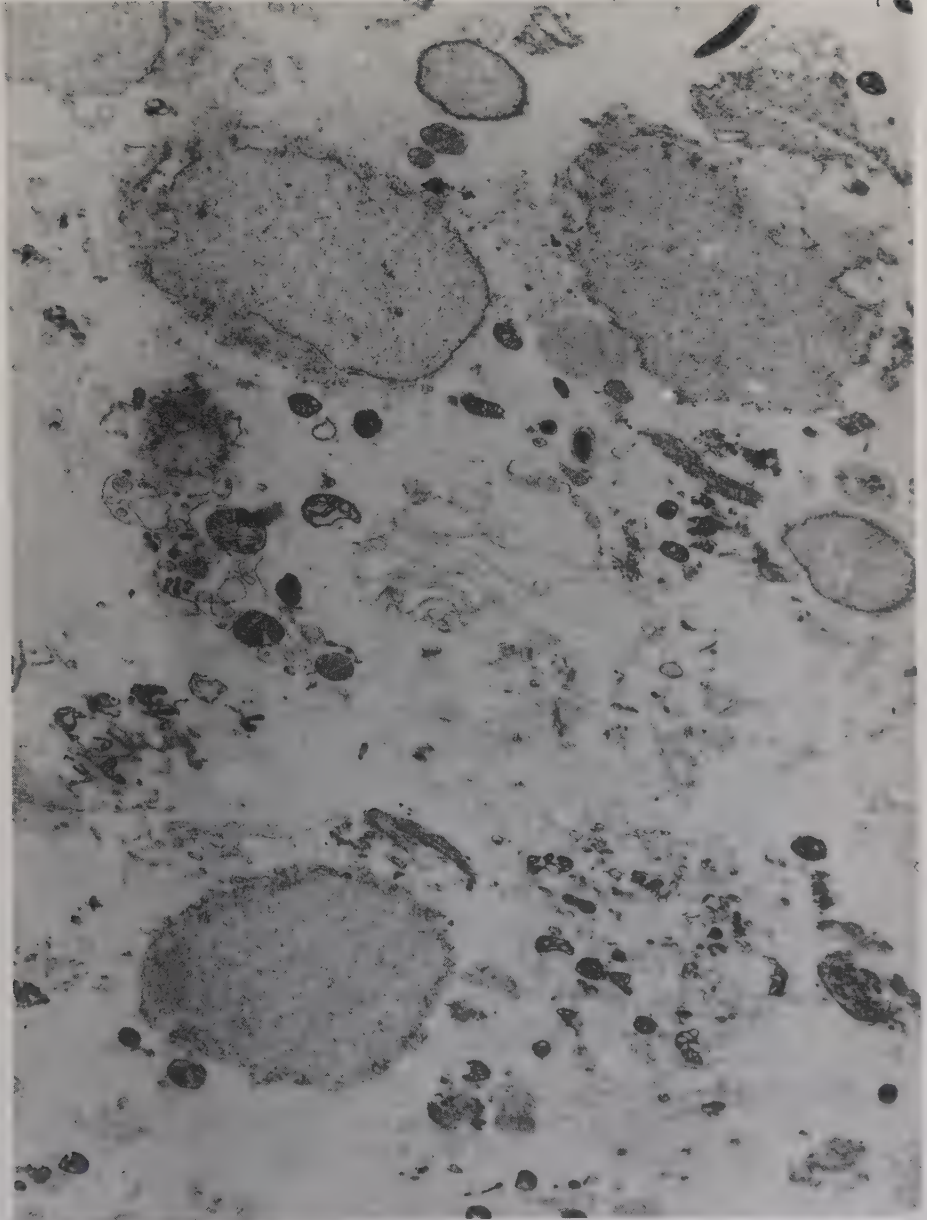


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des 1000 x g Sediments der homogenisierten Cäcummucosa einer PÄG-vorbehandelten Ratte

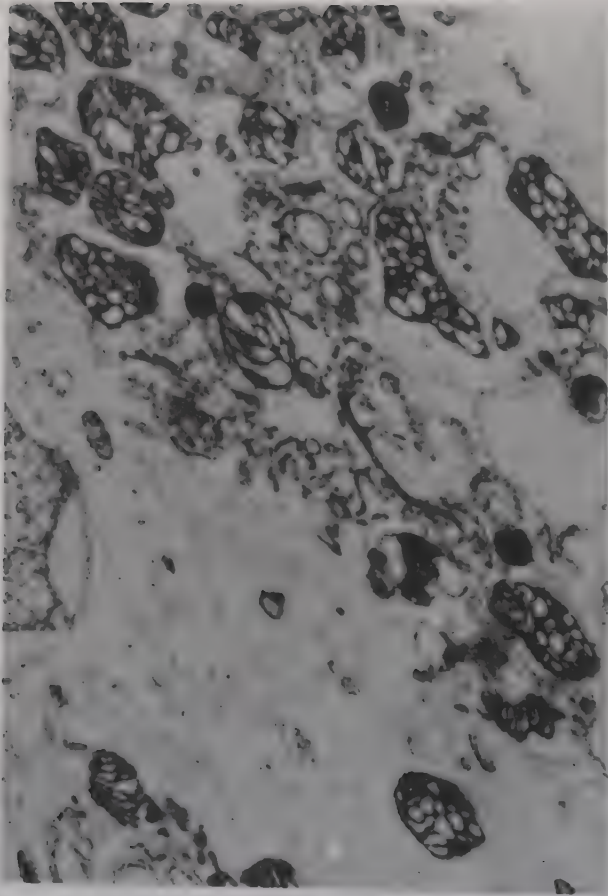


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des 9000 x g Sediments der homogenisierten Cäcummucosa einer PÄG - vorbehandelten Ratte

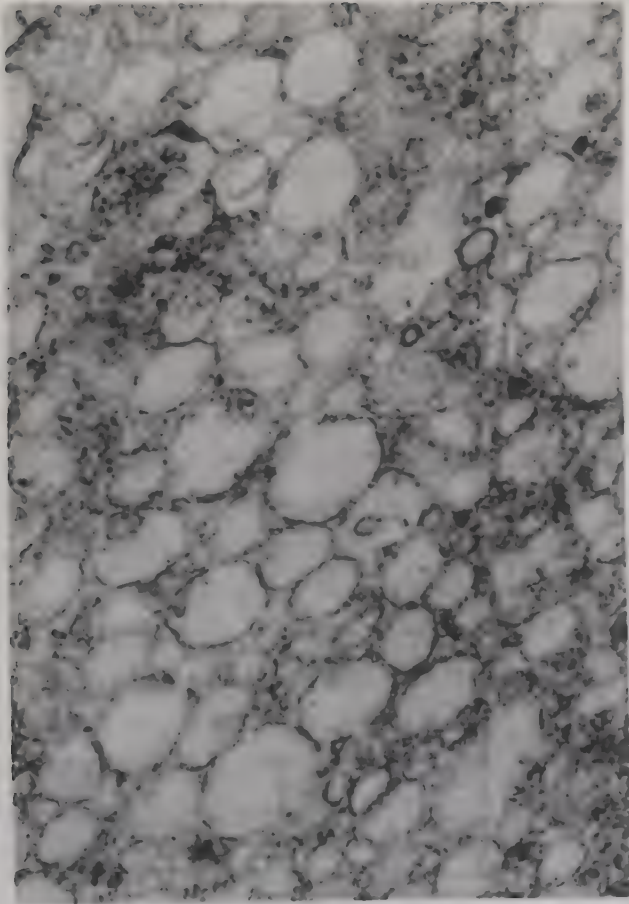


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme des
105 000 x g Sediments der homogenisierten
Cäcummucosa einer PAg-vorbehandelten Ratte.

lichen Definition verstehen wir unter der Mikrosomenfraktion diejenige Fraktion, die bei 100 000 x g in der Ultrazentrifuge als Sediment gewonnen wird. Es handelt sich um eine strukturell, funktionell und chemisch heterogene Fraktion, die zu großen Anteilen die Komponenten des endoplasmatischen Reticulums enthält, darüber hinaus in unterschiedlichen Anteilen Zellmembran-Fragmente, Bruchstücke der Mitochondrien, sowie den Golgiapparat und Lysosomen.

Die Homogenisation des Gewebes wurde im Kühlraum bei einer Temperatur von 0 - 4° C, alle Zentrifugationsschritte in gekühlten Zentrifugen bei 2 - 4° C durchgeführt. Vom Gesamthomogenat und allen nachfolgenden Überständen und resuspendierten Sedimenten wurde ein Aliquot für die Enzymbestimmung entnommen und bis zur Messung der Aktivitäten bei - 20° C für maximal 3 Tage eingefroren. In Vorversuchen wurde, gemessen an frischen Enzympräparationen, keine Alterung der Fraktionen oder Alteration der ATPasen während der 3-tägigen Einfrierung beobachtet, was mit dem Verhalten anderer ATPase - Präparationen unter diesen Bedingungen übereinstimmt (77). Das Fraktionierungsschema ist in Abb.4 nochmals zusammengefaßt.

Abb. 4 Fraktionierungsschema

Fraktion	Behandlung	Ergebnis
Cäcummucosa	Homogenisation	Gesamthomogenat
Gesamthomogenat	Zentrifugation 10' x 1 000 x g	Überstand 1.1 Sediment 1.1
Überstand 1.1	Zentrifugation 10' x 1 000 x g	Überstand 1.2 Sediment 1.2
Überstand 1.2	Zentrifugation 15' x 9 000 x g	Überstand 2 Sediment 2
Überstand 2	Zentrifugation 90' x 105 000 x g	Überstand 3 Sediment 3

4. Bestimmung der Adenosintriphosphatase-Aktivität

a) Bestimmungsmethoden

Seit den Angaben von Du Bois and Potter (11) wurde meist der Zuwachs an Orthophosphat während der Inkubationszeit als Maß der Adenosintriphosphatase - Wirkung genommen. Daneben existiert eine optische Methode der Adenosintriphosphatase - Messung, wobei das bei der ATP-Spaltung entstehende ADP mittels Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase wieder zu ATP rephosphoryliert wird (37,103). Dadurch entfällt die Produkthemmung durch ADP, so daß höhere Aktivitäten bei konstanter Substratkonzentrat gemessen werden. Statt freigesetztes Orthophosphat wird bei dieser Versuchsanordnung das bei der Rephosphorylierung von ADP aufgenommene Pyruvat mit NADH umgesetzt. Der Nachteil dieser Methode beruht auf der Phosphoenolpyruvatspaltung durch die Enzymlösung verunreinigende Phosphatasen. In extrem Phosphatase-reichen Geweben wie der Darmschleimhaut, wird die Messung der Adenosintriphosphatase mit dieser Methode kritisch, so daß sich für unsere Untersuchungen die bewährte Bestimmung von Orthophosphat anbot.

b) Aktivitätsbestimmung der Na-K-ATPase nach Bonting (12)

Dieses Verfahren empfiehlt sich wegen seiner großen Genauigkeit für Messungen im Gesamthomogenat und in den subzellulären Fraktionen. Prinzip:

Aus ATP freigesetztes Orthophosphat wird photometrisch be-

stimmt. Die Verwendung unterschiedlicher Inkubationsmedien für das Enzym erlaubt Inkubation unter der Bedingung optimaler Aktivierung bzw. vollständiger Hemmung.

Umsalzen von Na - ATP in Tris - ATP

Voraussetzung für jegliche Messung ist eine annähernd natriumfreie ATP-Präparation. Am besten wird ATP in das Tris - Salz übergeführt. 56.21 mg Dinatrium-adenosintriphosphat wurden mit 700 μ l 75 mM/l Tris pH 7.6 und mit 300 μ l 0.5 M/l Tris ad pH 7.0 neutralisiert.

Durchführung

Wir haben uns an das modifizierte Verfahren nach Kinne gehalten (60,69). Die Enzymaktivitäten wurden in Aliquots der Fraktionen bestimmt, wobei die Messung in 3 verschiedenen Medien erfolgte: Dem Inkubationsmedium (75 mM/l Tris-Puffer) wurden zugesetzt in:

Medium A 6 mM/l MgSO_4 , 3 mM Tris - ATP

Medium B 6 mM/l MgSO_4 , 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM Tris-ATP

Medium C 6 mM/l MgSO_4 , 100 mM NaCl, 20 mM KCl,
2 mM Ouabain, 3 mM Tris - ATP

Inkubation in Medium B führte zu maximaler Aktivität (vgl. Abb.16), in Medium C war die Na-K-ATPase vollständig durch Ouabain (g - Strophantin) gehemmt (vgl. Abb.19). Medium A ergab in Abwesenheit von Na und K die Aktivität der Mg-ATPase.

Abbildung 5

Schema Pipettier-Ansatz bei der Bestimmung der Na-K-ATPase in ul (Inkubationsvolumen 0.5 ml)

	Standard- Leerwert	Standard	Substrat- Leerwert	Gewebewerte		
				A	B	C
Tris-Puffer 75 mM	440	390	420	360	320	220
NaCl	20	20	20		20	20
KCl	20	20	20		20	20
MgSO ₄	20	20	20	20	20	20
Ouabain						100
Gewebe				100	100	100
Tris - ATP			20	20	20	20
3- PO ₄		50				

Definitionsgemäß ergibt sich die Aktivität der Na-K-ATPase somit zum einen aus der Differenz der in Medium B und A gemessenen Aktivität (Na-K-Mg-ATPase minus Mg-ATPase), zum anderen aus der Aktivitätsdifferenz zwischen Medium B und C (Na-K-Mg-ATPase minus der Aktivität nach vollständiger Hemmung des Na-K-stimulierbaren Anteils der Gesamt-ATPase durch Ouabain). Beide Bestimmungsmethoden ergaben bei jeweils durchgeführten Doppelbestimmungen Mittelwerte, die sich nicht signifikant unterschieden. Wir bezeichnen demnach in der Folge die Differenz der in Medium B und C gemessenen Aktivität als Na-K-ATPase.

Ausführung:

Das Reaktionsvolumen von 0.5 ml (Schema A5) wurde mit dem Eppendorf - Pipettensystem in Kälte pipettiert, die ATPase-Reaktion durch Zugabe von 0.1 ml Gewebesuspension gestartet und nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C durch Abkochen der Reaktionsgefäße bei 100° C gestoppt.

Ausführung der Phosphatbestimmung:

Die colorimetrischen Methoden für die quantitative Analyse von Orthophosphat beruhen zumeist auf der Bildung der schwach gelb gefärbten Phosphormolybdänsäure in saurer Lösung aus Phosphorsäure und Molybdänsäure und ihrer Reduktion zum tiefblauen Molybdänblau.

Reagenzien:

Ammoniumheptamolybdat 840 mg in 100 ml 2 NH_2SO_4 = Lösung 1

Ascorbinsäure 20 % = Lösung 2

Die Lösungen wurden getrennt in der Kälte ($2-4^\circ \text{C}$) aufbewahrt. Erst kurz vor der Verwendung wurden 6 ml der Lösung 1 mit 1 ml der Lösung 2 gemischt, das Phosphatreagenz wieder in Eis aufbewahrt.

Standard: Na_2HPO_4

Eichkurve:

17.8 mg Na_2HPO_4 wurden in 10.0 ml Aqua bidest gelöst. Diese Stammlösung enthielt in 100 μl ein μM anorganisches Phosphat. Abb. 6 zeigt die Phosphateichkurve.

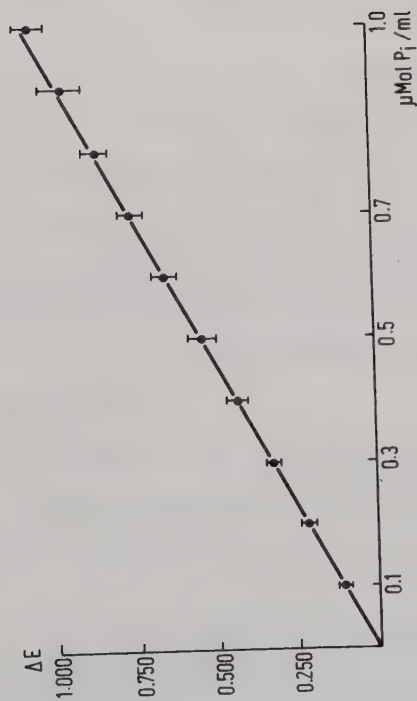


Abbildung 6: Phosphat - Eichkurve: Beziehung der optischen Empfindlichkeit (Extinktion) E zur Konzentration der verwendeten Phosphat - Eichlösung.
Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD. (n = 56)

Durchführung der Phosphatbestimmung

Nach 2-minütiger Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14 000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 3200) wurde das anorganische Phosphat in Aliquots des Überstandes mit der Methode nach Fiske und Subbarrow (32) modifiziert nach Bartlett bestimmt (7).

20 µl des Überstandes wurden zu 480 µl Aqua bidest in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 0.5 ml des Phosphatreagenz in Kälte zugegeben. Das Reaktionsvolumen wurde kurz gemischt und anschließend 7 Minuten bei 60° C inkubiert. Nach Abkühlung der Gefäße in Kälte erfolgte die Messung der Farbintensität bei 830 nm (Spectralphotometer Zeiss PMQ II, 1 cm Glasküvetten).

Berechnung:

$$E_{\text{Probe}} - E_{\text{Substratleerwert}}$$

$$\text{-----} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} =$$

$$E_{\text{Standard}} - E_{\text{Standardleerwert}}$$

$$\text{Aktivität der ATPase} = \left(\frac{\mu\text{M Pi}}{h} \right)$$

Proteinbestimmung mit dem Reagenz von Folin-Ciocalteu (34)

Prinzip:

Die zuerst von Lowry (73) beschriebene sehr empfindliche Methode basiert auf 2 gleichzeitig ablaufenden Phänomenen: Der Bildung eines gefärbten Kupferkomplexes durch die Anwesenheit von Peptidbindungen und der Reduktion von Phosphor-Molybdän - Säure und Phosphor-Wolframsäure durch die im Eiweiß vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Die Ausführung dieser Methode führt zu sehr genauen und reproduzierbaren Ergebnissen, wenn auch Störungen durch Aminosäuren, Phenole und Purine hervorgerufen werden. Diese lassen sich jedoch durch vorhergehendes Ausfällen mit Trichloressigsäure vermeiden.

Geräte und Reagenzien:

Eppendorf Reaktionsgefäße 3810, Eppendorf Rotationsmischer 3300, Eppendorf Mikroliterpipetten, Zeiss Spectralphotometer PMQ II, 1 cm Glasküvetten.

Natrium-carbonat - Lösung 2 %

Kalium-Natrium-tartrat - Lösung 2 %

Kupfersulfat - Lösung 1 %

Diese 3 Lösungen wurden in Kälte getrennt aufbewahrt und erst kurz vor Gebrauch in nachstehendem Verhältnis zum Lowry -

Reagenz gemischt:

25 ml 2 % Natrium-carbonat - Lösung
0.5 ml 2 % Kalium-Natrium-tartrat - Lösung
0.5 ml 1 % Kupfersulfat - Lösung

Folin-Ciocalteus - Phenolreagenz

Die handelsübliche Lösung wurde mit Aqua bid. 1:2 verdünnt.

Standard:

Serum - Albumin vom Rind, trocken, reinst

Eichkurve:

10 mg Serumalbumin wurden in 10 ml Aqua bid. gelöst. Diese
Stammlösung wurde dann folgendermaßen weiterverdünnt:
10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 und 70 ug/ml.

Durchführung:

Pipettieransatz: Inkubationsvolumen 1.0 ml

	Leerwert	Standards		Gewebewerte	
10 % Trichloressigsäure	900	950	900	950	900
Trispuffer pH 7.6 75 mM	100	-	-	-	-
Gewebe/standard	-	50	100	50	100

Die Ansätze wurden in Kälte pipettiert, kurz gemischt und
dann 30 Minuten in Eis aufbewahrt. Anschließend wurde das
Reaktionsvolumen 5 Minuten zentrifugiert, der dabei entstan-
dene Überstand vorsichtig abgegossen und verworfen. Im Reak-

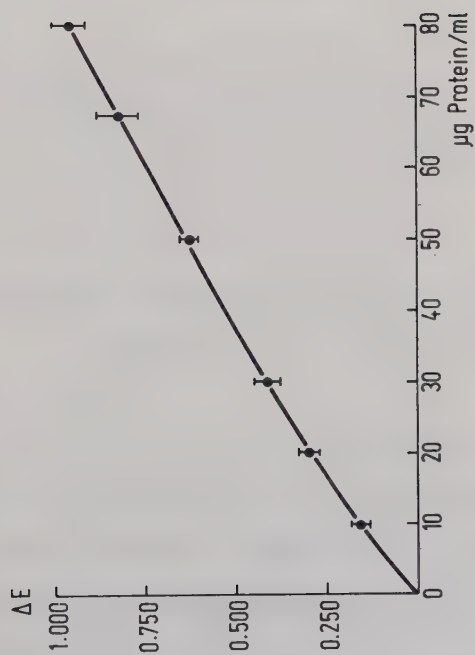


Abbildung 7: Protein - Eichkurve: Beziehung der optischen Empfindlichkeit (Extinktion) E zur Konzentration der verwendeten Protein - Lösung.
Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD. (n = 56)

tionsgefäß verbliebene Tropfen wurden mit Kleenex entfernt. Das präzipitierte Protein wurde durch Zugabe von je 100 µl in NaOH wiedergelöst, wobei die Reaktionsgefäße zwei Minuten gründlich geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 37° C inkubiert wurden. Nach Zugabe von je 1 ml Lowry - Reagenz wurden die Reaktionsgefäße erneut geschüttelt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Sofort nach Zugabe von je 100 µl Folin - Reagenz wurde das Inkubationsvolumen gut durchgemischt und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Farbintensität bei 750 nm gegen den Leerwert in 1 cm Glasküvetten.

Berechnung:

$$(\text{Extinktion Probe} / \text{Extinktion Standard}) \times \text{Konzentration Standard} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor}.$$

Anmerkungen:

- 1) Da sich die Reagenzien durch Lagerung verändern und dadurch die Farbintensität beeinflusst wird, ist bei jeder Bestimmung eine Standardeichkurve mitaufzustellen.
- 2) Die Extinktion ist der Konzentration nicht genau parallel (Abb. 7). Die Proben wurden daher so verdünnt, daß sie in den linearen Bereich der Eichkurve zu liegen kamen.

Elektronenmikroskopie:

Die elektronenoptischen Aufnahmen der subzellulären Schleim-

hautfraktionen verdanken wir Herrn Professor Dr. G. Hübner (Patholog. Institut der Universität München).

Reagenzien:

Sämtliche Reagenzien wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt bezogen, mit Ausnahme von ATP-Na₂ (Boehringer, Mannheim) und Rinderalbumin (Behring, Marburg).

Statistische Auswertung:

Alle Angaben beziehen sich auf den arithmetischen Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SE). Die statistische Signifikanz der Differenz der Mittelwerte einzelner Versuchsgruppen wurde mit Hilfe des t - Tests nach Student ermittelt, wobei $p < 0.05$ als statistisch signifikant galt.

Ergebnisse

I. Beobachtungen am Gesamttier

Wie bereits bei vorausgegangenen Untersuchungen beschrieben (68), zeigten die mit PÄG gefütterten Tiere einige klinisch auffällige Besonderheiten. Diese Befunde wurden am gegenwärtigen Kollektiv nicht erneut quantifiziert, wohl aber qualitativ bestätigt. So wurden die PÄG-haltigen Lösungen von den Versuchstieren bereitwillig in Mengen getrunken, die etwa das Doppelte der normalen Wasseraufnahme ausmachte (ca. 40 gegenüber 20 ml/Tag). Aufgrund der osmotischen Wirkung des nicht resorbierbaren Polymers traten Durchfälle auf. Dabei änderte sich die tägliche Futteraufnahme nicht. Trotzdem nahmen die Versuchstiere langsamer an Gewicht zu, so daß bei gleichen Ausgangswerten ihr Körpergewicht nach 4 Wochen etwa 10 % und nach 8 Wochen etwa 20 % unter dem der gleichaltrigen Kontrolltiere lag. Diese relative Gewichtsabnahme beruhte sicherlich teilweise auf Substanzverlust bei ungenügender Nahrungsresorption aufgrund der osmotischen Durchfälle, teilweise aber auch auf einer geringen chronischen Dehydrierung mit Zunahme der Serumosmolarität, des Bluthämatokrits, sowie der Serumkonzentration von Natrium und Chlorid (68). Gleichzeitig trat eine Polyurie auf, deren Genese bisher ungeklärt ist. Das psychische Verhalten war augenfällig verändert: die Kontrolltiere zeigten Normal- bis Aggressivver-



Abbildung 8: Cäcum einer Kontrollratte (links) und einer Ratte nach 2-monatiger Fütterung mit Polyäthylenglykol.

halten, während die PÄG-Tiere einen antriebsarmen Eindruck machten.

II. Makroskopische Beobachtungen am Cäcum

Nach Eröffnung des Abdomens imponierte beim PÄG-Tier bereits in situ ein stark vergrößertes Cäcum, dessen Wand auffallend dünn und transparent erschien (Abb. 8). Die benachbarten Darmabschnitte des Ileums und des Colons erschienen dagegen makroskopisch unauffällig. Bei Eröffnung des Organs fand sich ein vermehrtes Volumen breiigen Inhalts mit flüssigem Überstand. Die Kontrolltiere dagegen zeigten keine Transparenz der Cäcumwand, ihr Darminhalt war von festerer Konsistenz.

III. Feuchtgewicht und Proteingehalt der Mucosa

Die Vergrößerung des Cäcums machte sich nicht nur durch die Volumenzunahme, sondern auch durch eine Oberflächenvergrößerung und einen Anstieg des Trockengewichts des Gesamtorgans bemerkbar (68).

In den gegenwärtigen Untersuchungen dienten als Parameter für die Massenzunahme der Schleimhaut das Feuchtgewicht und die Proteinmenge, die in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol bestimmt wurden.

a) Feuchtgewicht

Das Feuchtgewicht der isolierten Mucosa verhielt sich bei den

Kontrolltieren sehr einheitlich. Die Einzelwerte für die im Verlauf der 2 Monate untersuchten Tiere streuten zwischen 379 mg und 448 mg, wobei sich für die verschiedenen Kollektive zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ergab. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen (92) überein. In Abb. 9 ist daher lediglich der SEM-Bereich angegeben.

Bei den 3 - 5 Tieren pro Gruppe, die 2 - 56 Tage mit PÄG gefüttert worden waren, zeigte das Mucosafeuchtwicht dagegen eine Abhängigkeit von der Fütterungsdauer. Gegenüber dem Mittelwert aller Kontrolltiere war es bereits nach 2 Tagen signifikant erhöht ($p < 0.005$, vgl. auch Tab. 2), stieg innerhalb der ersten 14 Tage weiter rasch an und erreichte nach Übergang in einen abgeflachteren Zeitverlauf nach 2 Monaten das Doppelte des Ausgangswertes (Abb. 9, Tab. 2).

b) Protein

1. Gesamthomogenat

Die Proteinmenge der abgeschabten Mucosa wurde nach Homogenisierung im Gesamthomogenat ermittelt.

Wie ebenfalls aus Abb. 9 und Tab. 2 ersichtlich, nahm die Proteinmenge der PÄG-exponierten Mucosa bereits nach 2 Tagen Fütterung statistisch signifikant zu, ferner war ein kontinuierlicher Anstieg über die gesamte Versuchsperiode zu verzeichnen, so daß die Proteinmenge mit 105.4 mg gegenüber dem

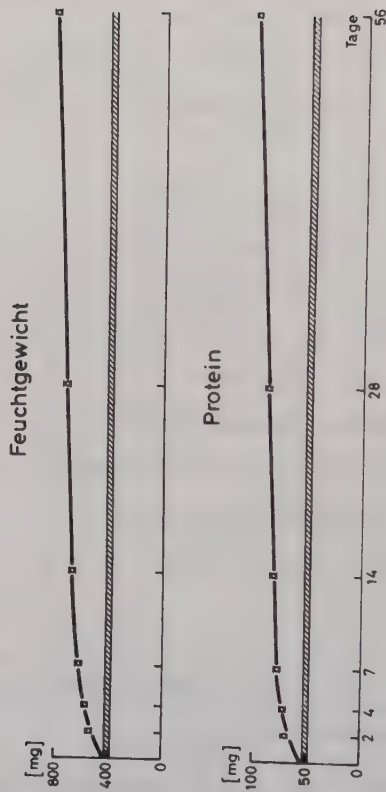


Abbildung 9: Zunahme von Feuchtwicht (oben) und Proteinmenge (unten) der isolierten *Caccumucosa* in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol. Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 - 5 Tieren pro Gruppe. Die schraffierten Flächen geben den SEM-Bereich von 10 Kontrollen an.

Kontrollwert von 50.0 mg nach 2 Monaten verdoppelt war. Die Kontrolltiere ließen während des Versuchszeitraumes keine signifikante Änderung dieser Meßgröße erkennen.

2. Subzelluläre Verteilung

Tab. 1 zeigt die prozentuale Verteilung des Proteins auf die einzelnen subzellulären Fraktionen bei Kontrolltieren. In Korrespondenz zu den Befunden, die am normalen Dünndarm der Ratte sowohl an der abgeschabten Mucosa (85) als auch an isolierten Epithelzellen (21) erhoben wurden, fand sich der größte prozentuale Anteil als lösliches Protein des Cytosols im Überstand nach hochtouriger Zentrifugation ($105\ 000 \times g$), während die Mikrosomenfraktion nur wenig Protein enthielt.

Am hypertrophierenden Cäcum war die Proteinverteilung auf die einzelnen Fraktionen praktisch identisch, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt der Fütterung gemessen wurde. Im $1000 \times g$ Sediment (S_1), $9000 \times g$ Sediment (S_2), im $105\ 000 \times g$ Sediment S_3 und im Überstand nach dieser Zentrifugation ($\ddot{U}_3$) schwankten die Werte zwischen 10.4 - 11.7 % bzw. 24.1 - 26.7 bzw. 8.2 - 8.9 % bzw. 55.2 - 57.1 %. Damit ergab sich für keine Gruppe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrolltiere.

Durch Addition der prozentualen Anteile der Sedimente S_1 , S_2 , S_3 und des finalen Überstandes ergab sich eine Wiederfindung des Proteins für die Kontrolltiere von 101 %. Analoge Berech-

Tab. 1 Prozentuale Verteilung des Proteins in subzellulären Fraktionen der isolierten Cäcummucosa bei Kontrollratten und bei Ratten nach Fütterung mit Polyäthylenglykol

	GHO	Fraktion (% des Gesamthomogenats)				Recovery
		S ₁	S ₂	S ₃	Ü ₃	
Kontrollen	100	10.1 ± 0.3 ^a	26.6 ± 1.0	8.7 ± 0.2	56.0 ± 1.4	101.4
	2 Tage	10.5 ± 0.6	25.7 ± 1.5	8.6 ± 0.1	55.3 ± 0.1	100.1
PÄG-Tiere	4 Tage	11.7 ± 0.9	25.0 ± 0.8	8.3 ± 0.3	55.6 ± 1.2	100.6
	7 Tage	10.4 ± 0.6	24.1 ± 1.0	8.2 ± 0.4	55.2 ± 0.9	97.9
	14 Tage	10.7 ± 0.5	24.1 ± 1.4	8.3 ± 0.5	57.1 ± 1.7	100.2
	28 Tage	10.4 ± 0.4	24.3 ± 1.0	8.9 ± 0.2	55.2 ± 0.6	98.8
	56 Tage	10.7 ± 0.3	26.7 ± 1.2	8.2 ± 0.4	55.3 ± 1.1	100.9

^a Arithmetische Mittelwerte ± SE

n = 10 Kontrolltiere, je 3 - 5 pro PÄG-Gruppe

nungen ergaben für die PÄG-Tiere Werte von 97.9 - 101.4, wobei die arithmetischen Mittelwerte sich wiederum nicht signifikant von dem der Kontrollen unterschied.

c) Proteinkonzentration pro Gramm Feuchtgewicht

In Tab. 2 ist die Proteinkonzentration pro Gramm Feuchtgewicht bei Kontrolltieren und PÄG-behandelten Tieren in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung dargestellt. Wie nach der zeitparallelen Entwicklung dieser Parameter bereits zu erwarten war, lagen alle errechneten mittleren Konzentrationen im SD - Bereich der Kontrolltiere. Alle Werte sind von den Kontrollen nicht signifikant unterschieden ($p > 0.05$), was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt (92). Wir wählten somit als Bezugsparameter für die Enzymaktivitäten die Proteinmenge.

IV. Na-K-ATPase

a) Na-K-ATPase im Gesamthomogenat

Die in früheren Untersuchungen (69) beobachtete Erhöhung der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase war im Gesamthomogenat von Tieren gefunden worden, die das Polymer 7 - 12 Tage erhalten hatten, sich also an einem Entwicklungspunkt befanden, an dem der Natriumtransport pro Gewebeeinheit bereits maximal stimuliert war, während das Organ noch weiter wuchs. In unseren jetzigen Untersuchungen verfolgten wir die Zunahme der Enzymaktivitäten über einen Zeitraum von 2 Monaten.

Tab. 2 Proteinkonzentration (mg/g Feuchtwicht der isolierten Cäcummucosa bei Kontrollen und bei Ratten nach Fütterung mit Polyäthylenglykol

	Anzahl	Mucosafeucht- gewicht (mg)	Protein- menge (mg)	Protein- konzentration (mg/g)
Kontrollen	10	406.7 ± 6.9 ^a	50.0 ± 1.0	123.0 ± 1.6
PÄG 2 Tage	4	553.6 ± 5.5 ⁺	66.8 ± 0.9 ⁺	120.6 ± 1.0 ⁺⁺
4 Tage	3	579.1 ± 7.0 ⁺	69.0 ± 2.0 ⁺	119.2 ± 4.1 ⁺⁺
7 Tage	5	631.3 ± 15.1 ⁺	76.4 ± 2.5 ⁺	120.9 ± 1.5 ⁺⁺
14 Tage	4	680.9 ± 2.9 ⁺	83.5 ± 0.7 ⁺	122.7 ± 0.8 ⁺⁺
28 Tage	5	731.4 ± 7.1 ⁺	90.1 ± 1.4 ⁺	123.3 ± 1.2 ⁺⁺
56 Tage	4	827.2 ± 12.3 ⁺	105.4 ± 1.4 ⁺	127.5 ± 1.8 ⁺⁺

^a Arithmetische Mittelwerte ± SE

⁺ p < 0.005, verglichen mit dem Kontrollkollektiv

⁺⁺ p > 0.05, verglichen mit dem Kontrollkollektiv

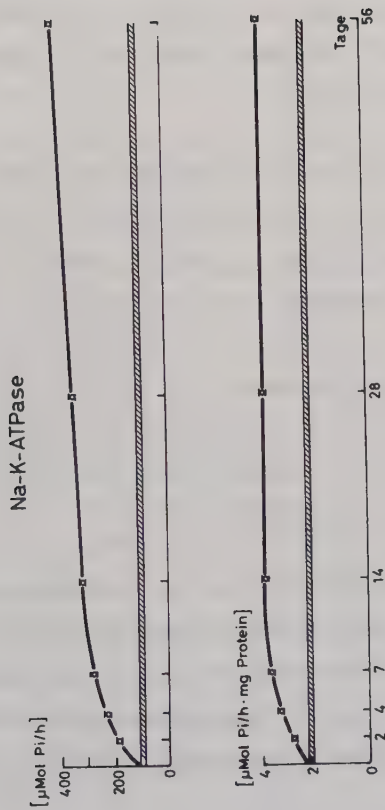


Abbildung 10: Zunahme der Aktivität (oben) und der spezifischen Aktivität (unten) der Na-K-ATPase im Gesamthomogenat der isolierten Cäcummucosa in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol. Mittelwerte von 3 - 5 Tieren pro Gruppe + SEM. Die schraffierten Flächen geben den SEM-Bereich von 10 Kontrollen an.

Abb.10 zeigt die Aktivität (Gesamtmenge an Na-K-ATPase) sowie die spezifische Aktivität (Aktivität pro Proteinmenge) bei Kontrollen und bei PÄG-Tieren. Bei den Kontrolltieren zeigte die Aktivität der Na-K-ATPase wie auch das Feuchtgewicht und das Protein keine Zunahme.

Nach PÄG-Fütterung vervierfachte sich die Aktivität der Na-K-ATPase innerhalb der 2 Monate. Im Vergleich zu den Parametern Feuchtgewicht und Protein war die Zunahme somit deutlich größer. Wurde die Enzymmenge daher auf den Proteingehalt der Mucosa bezogen, so ergab sich eine zusätzliche Steigerung. Der Zeitverlauf ließ erkennen, daß die höchste spezifische Aktivität nach 7 - 14 Tagen erreicht war und jetzt 170 % des Kontrollwerts betrug. Dieses Maximum wurde bis zum Ende der Fütterungsperiode beibehalten.

Diesem Zeitverlauf ist zu entnehmen, daß sich Massen- und Funktionszunahme des Cäcums offenbar dissoziiert entwickelten. Die Stimulierung der ATPase war bereits zu einem Zeitpunkt abgeschlossen, zu dem die Massenentwicklung erst $\frac{2}{3}$ ihres Endwertes betrug (vgl. Feuchtgewicht und Proteinmenge in Tab. 2).

b) Prozentuale Verteilung der Na-K-ATPase auf die subzellulären Fraktionen

1. Normaltiere

Tab.3 gibt die prozentuale Verteilung der Na-K-ATPase in

den subzellulären Fraktionen der isolierten Mucosa bei Kontrollratten wieder. Die Na-K-ATPase fand sich erwartungsgemäß überwiegend (71 %) in unserer plasmamembranreichen Fraktion (S_3) wieder. In Übereinstimmung mit vergleichbaren Präparationen anderer Organe (35,58) zeigte das mitochondriale Sediment (S_2) nur geringe Aktivität. Die im groben Sediment S_1 gemessenen Aktivitäten dürften auf nicht aufgeschlossene Zellen und größere Zellmembranfragmente zurückgehen. Die Wiederfindungsrate lag bei den Kontrollen, wie auch bei sämtlichen mit PÄG-vorbehandelten Tieren bei 97 - 101 % (Tab. 3).

2. PÄG-exponierte Tiere

Ebenfalls aus Tab. 3 geht hervor, daß während der Hypertrophieentwicklung eine Verschiebung innerhalb der prozentualen Verteilung der Na-K-ATPase eintrat, wobei der Anteil der sog. Kernfraktion S_1 zugunsten der mikrosomalen Fraktion abnahm. Dieses Ergebnis ist umso bemerkenswerter, als wir diese Umverteilung nur bei der Na-K-ATPase, nicht jedoch bei der subzellulären Verteilung des Proteins (s. S. 36) und der Mg-ATPase (s. S. 47) beobachteten. Die Gründe für diese Umverteilung sollen später erörtert werden (vgl. Diskussion S. 66).

c) Spezifische Aktivität der Na-K-ATPase in der mikrosomalen Subfraktion

Die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase in der mikrosomalen

Tab. 3 Prozentuale Verteilung der Na-K-ATPase in subzellulären Fraktionen
der isolierten Cäcummucosa von Ratten

Fraktion	Anteil am Gesamthomogenat (%)									
	Kontrollen			Vorbehandlung mit PÄG (Tage)						
	2	4	7	14	28	56				
S ₁	19.8 ± 0.3 ^a	15.6 ± 0.4	15.2 ± 0.5	15.3 ± 0.3	15.7 ± 0.5	13.0 ± 0.3				
S ₂	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.8	4.9 ± 0.8	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.4				
S ₃	71.4 ± 0.4	76.6 ± 1.1	76.5 ± 0.3	77.9 ± 0.1	78.3 ± 0.8	80.7 ± 0.8				
Ü ₃	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0				
Recovery	97.6 ± 0.7	98.4 ± 1.2	98.0 ± 1.3	99.1 ± 0.4	100.2 ± 1.2	99.8 ± 0.6				
n =	10	4	3	5	4	5				

a = arithmetischer Mittelwert ± SE

Subfraktion bei Kontrolltieren war mit $17.9 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ Protein (vgl. Abb.11) gegenüber einer solchen im Gesamthomogenat von 2.2 (Abb. 10) stark erhöht, was für die vorzugsweise Gebundenheit des Enzyms an die mikrosomalen Partikel spricht. Abb.11 veranschaulicht darüber hinaus, daß die Zunahme der spezifischen Aktivität des Enzyms in der hypertrophierenden Schleimhaut sich ebenfalls in der mikrosomalen Subfraktion abspielte. Wie im Gesamthomogenat war die Stimulation durch Fütterung des Polymers bereits nach 2 Tagen signifikant und das Maximum der spezifischen Aktivität mit einem Wert von $36.1 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ nach 7 - 14 Tagen erreicht.

Die spezifischen Aktivitäten der beiden anderen Subfraktionen der hypertrophierenden Schleimhaut lagen mit $2.0 - 2.3 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ für Sediment S_1 ($1000 \times g$) und $1.2 - 1.4 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ für Sediment S_2 ($9000 \times g$) im SE - Bereich der entsprechenden Mittelwerte für die normale Mucosa von $1.9 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ für S_1 und $1.2 \text{ uMol } P_i/h \cdot \text{mg}$ für S_2 .

d) Schlußfolgerungen

Aus parallel zu diesen Studien durchgeführten Untersuchungen über den Nucleinsäuregehalt der Mucosazellen bei der Hypertrophie des Rattencäcums wissen wir, daß die durch PÄG-Fütterung bedingte Zunahme des Feuchtgewichts und der Proteinmenge auf einer zellulären Hyperplasie beruht, wobei sich die Zusammensetzung der Zellen bezüglich DNS-, RNS- und Protein-

S₃

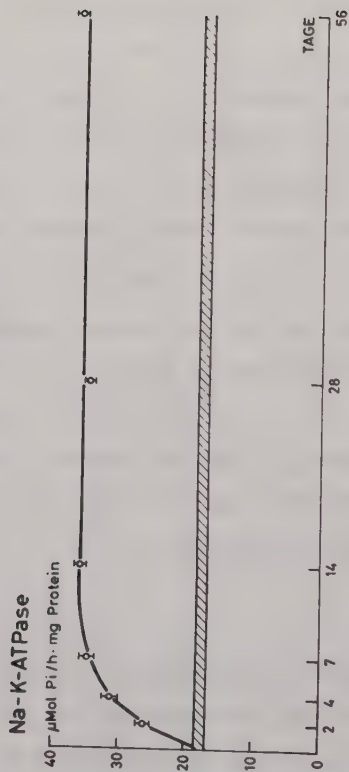


Abbildung 11: Zunahme der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase der mikrosomalen Subfraktion der isolierten *Caccumucosa* in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol. Mittelwerte von 3 - 5 Tieren pro Gruppe $\pm$ SEM. Die schraffierte Fläche gibt den SEM-Bereich von 10 Kontrollen an.

gehalt nicht ändert (91). Da die Aktivitäten der Na-K-ATPase im Vergleich zu der Entwicklung des Feuchtgewichts und der Proteinmenge nicht um den Faktor 2, sondern überproportional um einen solchen von 4 zunimmt, liegt somit eindeutig eine erhöhte Enzymaktivität pro Zelle vor. Diese Steigerung der Enzymaktivität spielt sich nach den in den subzellulären Fraktionen erhaltenen Ergebnissen ausschließlich an den mikrosomalen Partikeln ab.

V. Mg - ATPase

a) Gesamthomogenat

Abb.12 zeigt die Aktivität und die spezifische Aktivität der Mg-ATPase im Gesamthomogenat der isolierten Cäcummucosa bei Kontrolltieren und bei PÄG-exponierten Ratten. Bereits nach 2 Tagen war ein signifikanter Anstieg der Menge an Mg-ATPase zu verzeichnen, der aber auch im weiteren Zeitverlauf quantitativ genau der Zunahme der Proteinmenge entsprach, so daß die Aktivität am Ende der zweimonatigen Fütterungszeit um 100 % zugenommen hatte. Somit war die spezifische Aktivität der Mg-ATPase im Verlaufe der Hypertrophieentwicklung zu keinem Zeitpunkt von den Werten der Kontrolltiere signifikant verschieden. Die Kontrolltiere zeigten während des gesamten Versuchs keine Änderungen ihrer Mg-ATPase - Aktivität.

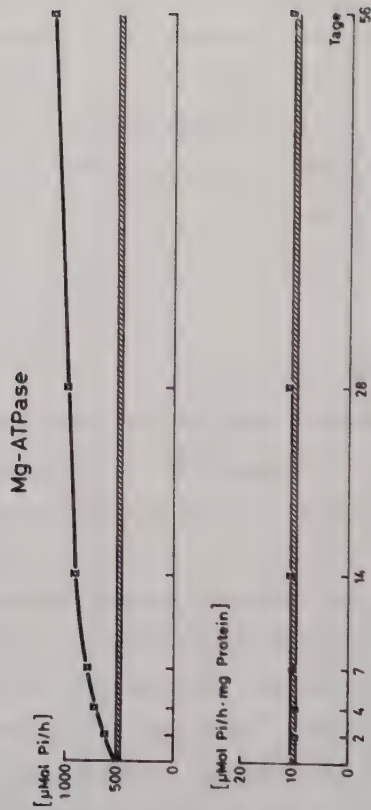


Abbildung 12: Aktivität (oben) und spezifische Aktivität (unten) der Mg-ATPase im Gesamthomogenat der isolierten Cäcummucosa in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol. Mittelwerte von 3 - 5 Tieren pro Gruppe $\pm$ SEM. Die schraffierten Flächen geben den SEM-Bereich von 10 Kontrollen an.

b) Subzelluläre Verteilung

Da die Mg-ATPase sowohl an die Plasmamembranen als auch an die Mitochondrien gebunden ist, könnte uns die subzelluläre Verteilung Aufschluß über das Verhalten dieser subzellulären Partikel während der Hypertrophie geben.

Aus Tab. 4 geht hervor, daß sich die Aktivität der Mg-ATPase etwa gleichmäßig auf die drei subzellulären Sedimente verteilte und der prozentuale Anteil der Subfraktionen durch die Hypertrophie nicht verändert wurde. Die Wiederfindungsrate der Mg-ATPase betrug zwischen 95 - 103 %.

c) Spezifische Aktivität der Mg-ATPase in den subzellulären Fraktionen während der Hypertrophie

Abb.13 belegt, daß, wie bereits vom Gesamthomogenat bekannt und bei unveränderter subzellulärer Verteilung der Mg-ATPase (Tab. 4) und der Proteinmenge (Tab. 1) während der Hypertrophie zu erwarten, es zu keiner statistisch signifikanten Zunahme der spezifischen Aktivität der Mg-ATPase in der mitochondrialen und mikrosomalen Fraktion kam.

d) Schlußfolgerungen

Die Zunahme der Aktivität der Mg-ATPase beruht somit ausschließlich auf der Zunahme der Zellzahl. Dieses Enzym zeigte damit ein Verhalten wie es von früheren Messungen einiger anderer strukturgebundener Enzyme im Gesamthomogenat der

Spezifische Aktivität der Mg-ATPase

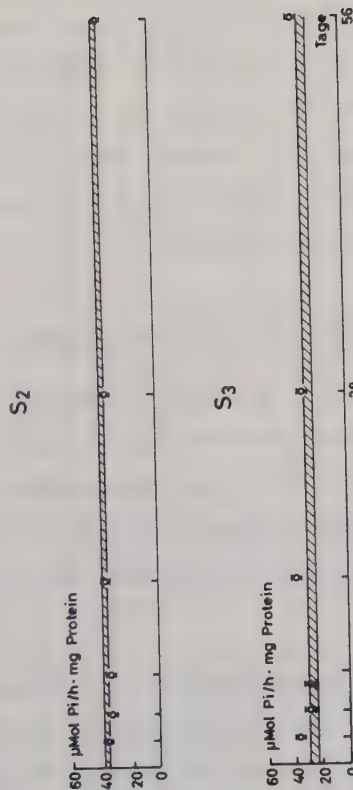


Abbildung 13: Spezifische Aktivität der Mg-ATPase im 9000 x g Sediment S₂ (oben) und im 105 000 x g Sediment S₃ (unten) der homogenisierten Cäcums- und mucosa in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung mit Polyäthylen-glykol. Mittelwerte von 3 - 5 Tieren pro Gruppe ± SEM. Die schraffierten Flächen geben den SEM-Bereich von 10 Kontrollen an.

hypertrophierenden Schleimhaut bekannt war: unter ihnen war die spezifische Aktivität der Marker-Enzyme Glutamatdehydrogenase (Mitochondrien) und alkalische Phosphatase (Bürstensaum) nicht verändert (69), so daß wir anhand dieser sowie unserer jetzigen Ergebnisse vermuten können, daß der Enzymbesatz dieser Strukturen während der Hypertrophie keinerlei spezifische Modifikationen erfährt.

VI. Relative spezifische Aktivität der ATPasen

Die Quotienten zwischen Na-K-ATPase, Mg-ATPase und Na-K-Mg-ATPase (= Gesamt-ATPase) sind deshalb besonders wertvoll, weil sie ein relatives Maß für die Anreicherung eines Enzyms in subzellulären Fraktionen geben und damit auch Aussagen über das relative Verhalten der Enzyme während der Hypertrophie erlauben.

Tab. 5 zeigt, daß die Na-K-ATPase im Gesamthomogenat der Kontrolltiere 18 % der Gesamt-ATPase-Aktivität ausmachte. Während der Hypertrophie stieg ihr Anteil auf maximal 25 %. In der mikrosomalen Fraktion waren 39 % der Gesamt-ATPase Na-K-stimulierbar, bei der Hypertrophieentwicklung betrug dieser Anteil maximal 50 %. Setzt man die spezifische Aktivität der Mg- bzw. der Na-K-ATPase bei den einzelnen Tiergruppen im Gesamthomogenat gleich 1, so wurde die Na-K-ATPase in der mikrosomalen Fraktion um den Faktor 9 angereichert, die

Tab. 5 Spezifische Aktivität der Na-K-ATPase im Gesamthomogenat und in der mikrosomalen Subfraktion der isolierten Cäcummucosa bei Kontrollen und bei Ratten nach Fütterung mit Polyäthylenglykol

Spezifische Aktivität ($\mu\text{Mol P}_i/\text{h} \cdot \text{mg Protein}$)		relative spezifische Aktivität	
Gesamthomogenat	Na-K-ATPase	Na-K-ATPase	Mg-ATPase
	Na-K-Mg-ATPase	Mg-ATPase	Mg-ATPase
Kontrollen	0.18	1.0	1.0
PÄG - 2 Tage	0.21	1.0	1.0
PÄG - 4 Tage	0.24	1.0	1.0
PÄG - 7-56 Tage	0.25	1.0	1.0
Mikrosomale Fraktion			
Kontrollen	0.39	8.2	2.9
PÄG - 2 Tage	0.42	9.3	3.2
PÄG - 4 Tage	0.49	9.4	3.1
PÄG - 7-56 Tage	0.50	9.5	3.1

Mg-ATPase dagegen nur um den Faktor 3, was bedeutet, daß sich der Quotient der spezifischen Aktivitäten von Na-K-ATPase zu Mg-ATPase in der mikrosomalen Fraktion im Vergleich zum Gesamthomogenat von 1 auf 3 verschiebt.

VII. Bestimmung der Na-K-ATPase in abgeschabten Epithelzellen der Mucosa, sowie im nach Abschabung verbliebenen Schleimhautrest

Bei den vorausgegangenen Untersuchungen an der isolierten Mucosa wurde eine präparative Technik angewandt, bei der die Lamina propria mucosae, die Lamina muscularis mucosae und variable Anteile der Tela submucosa zusammen mit der Mucosa isoliert wurden. Um einen eventuellen Einfluß dieser bindegewebigen und muskulären Elemente auf die Ergebnisse auszuschließen, untersuchten wir bei vier Kontrolltieren und bei vier Tieren, die sieben Tage PÄG-Lösung getrunken hatten, eine durch nur ganz oberflächliche Abschabung gewonnene reine Epithelzellfraktion (zur Validität der Methodik vgl. 92).

Auch in diesen Untersuchungen war die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase im Gesamthomogenat nach 7 - Tage PÄG-Exposition mit $4.5 \text{ uMol } P_i / \text{h} \cdot \text{mg}$ gegenüber $2.6 \text{ uMol } P_i / \text{h} \cdot \text{mg}$ auf ca. 170 % erhöht, lag aber absolut gesehen gegenüber dem Gesamthomogenat der Gesamtmucosa (2.2 bzw. 3.7) etwas höher. Daraus kann geschlossen werden, daß sich die Stimulation der

Na-K-ATPase auf der Ebene der Epithelzellen abspielt.

VIII. Die Eigenschaften der Na-K-ATPase

Die obigen Befunde über den Zeitverlauf der Na-K-ATPase bei der Hypertrophie der isolierten Cäcummucosa ließen in ihrer Interpretation zwei Wege offen: Zum einen könnte die Stimulation der Na-K-ATPase auf einem vermehrten Enzymmolekülbesatz der Zellmembranen beruhen, zum anderen könnte es im Gefolge der Hypertrophieentwicklung zu einer Abänderung der Moleküleigenschaften kommen. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, führten wir eine Reihe von kinetischen Studien mit der mikrosomalen Fraktion der isolierten Cäcummucosa von Kontrollratten durch, ferner von PÄG-Tieren zum Zeitpunkt der maximalen Stimulierung der spezifischen Aktivität nach 7-tägiger Fütterung. In beiden Kollektiven wurden die gleichen in vitro Bedingungen eingehalten.

a) Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit der Inkubationszeit

Wie in Abb.14 dargestellt, zeigte die Untersuchung der Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der Dauer der Inkubation für beide Tiergruppen in der Zeitspanne von 0 - 60 Minuten einen linearen Verlauf. Wir legten daher für alle anderen Versuche eine Inkubationsdauer von 30 Min. fest (s. auch Methodik S.).

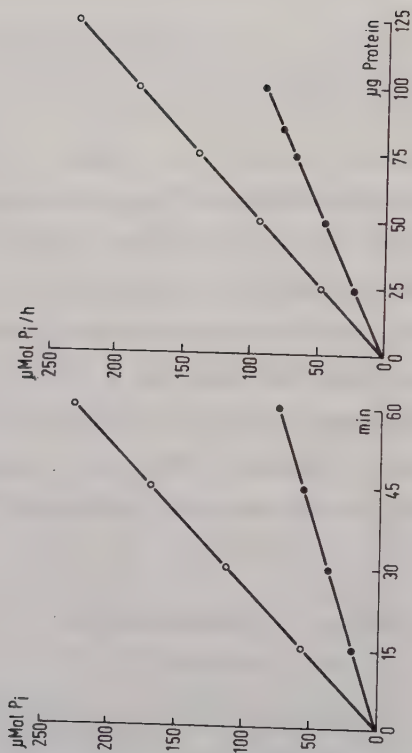


Abbildung 14: Abhängigkeit der ATP-Spaltung einer mikrosomalen Subfraktion der homogenisierten Cäcummucosa von der Dauer der Inkubation (links) und der Proteinmenge im Inkubationsvolumen (rechts). Mittelwerte von 4 Kontrollratten (dunkle Kreise) und 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (helle Kreise).

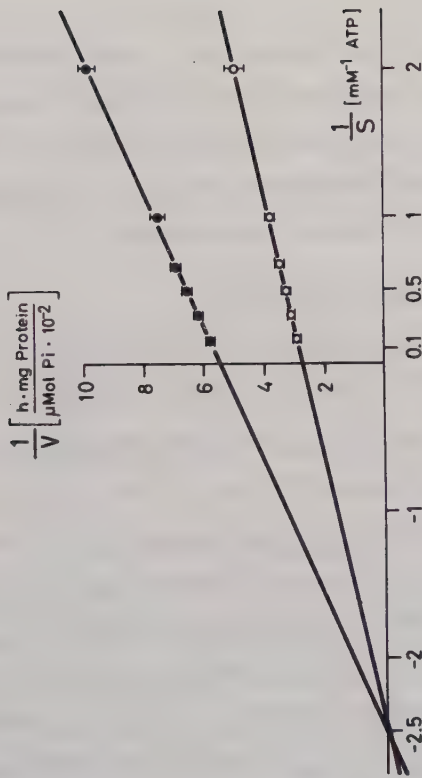


Abbildung 15: Lineweaver-Burk-Darstellung zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante für ATP der Na-K-ATPase der mikrosomalen Subfraktion der homogenisierten *Cacum mucosa*. Mittelwerte $\pm$ SEM für 4 Kontrollratten (dunkle Kreise) und 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (helle Kreise).

b) Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit von der Proteinmenge

In Abb. 14 zeigte sich im Bereich von 0 - 125 μ g Zellprotein im Inkubationsvolumen eine direkt proportionale Abhängigkeit der Na-K-ATPase-Aktivität von der Proteinmenge der normalen und hypertrophierenden Schleimhaut. Dieser Verdünnungsbereich wurde daher in allen Versuchen eingehalten.

c) Affinität der Na-K-ATPase zu ATP

Das Substrat für die Na-K-ATPase ist ATP, welches in ADP und anorganisches Phosphat hydrolysiert wird. Die Affinität zu anderen Nucleotiden ist um 2 - 3 Größenordnungen geringer (115).

In Abb. 15 ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration als Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Es zeigt sich, daß die Spaltungsrate von ATP ($v_{\max}$) während der Hypertrophie auf das Doppelte anstieg, während die halbmaximale Sättigungskonzentration k_m (Michaelis-Menten-Konstante) von ATP mit 0.4 mM für beide Tiergruppen gleich war. Bei der von uns in allen übrigen Versuchsreihen vorgelegten ATP-Konzentration von 3 mM beträgt die Sättigungskonzentration also 90 %.

d) Abhängigkeit der Na-K-ATPase-Aktivität vom Verhältnis Mg/ATP

Bei der Hydrolyse des ATP durch Na-K-ATPase ist sowohl der ATP - ADP Austausch als auch die Dephosphorylierung stark

Magnesiumionen abhängig (115).

Der Effekt steigender Mg-Konzentrationen bei unveränderter Substratkonzentration (3 mM) ist in Abb.16 gezeigt. In Übereinstimmung mit Präparationen anderer Organe (60,87,97,112) ergab sich für die optimale Aktivität in beiden Schleimhautpräparationen eine Mg-Konzentration von 6 mM, d.h. ein molares Mg/ATP-Verhältnis von 2, während eine überschießende Mg-Ionenkonzentration zu einem Abfall der Aktivität führte.

In Abwesenheit von Na und K ergab sich für die Mg-ATPase ein optimales Mg/ATP-Verhältnis mit einem Plateau zwischen 1 und 2.

e) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Natrium-Konzentration im Inkubationsmedium

Abb.17 zeigt die Na-Aktivierungskurve bei sonst unveränderter Zusammensetzung des Inkubationsmedium (Mg 6 mM, ATP 3 mM, K 20 mM). Aus der Darstellung läßt sich entnehmen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit maximal bei einer Na-Konzentration von 50 - 60 mM wurde. Der Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 17) für die Na-K-ATPase ist nicht linear, sondern zeigt bei niedrigen Na-Ionenkonzentrationen ein curvilineares sigmoidales Verhalten, was eine Abweichung von der Michaelis-Menten-Kinetik aufzeigt. Dieses kinetische Verhalten beinhaltet einen möglichen allosterischen Effekt, wie er in zahlreichen theoretischen Modellen beschrieben (62,78) und bereits für die Na und K-Aktivierung der ATPase diskutiert wurde (1,31,94-96).

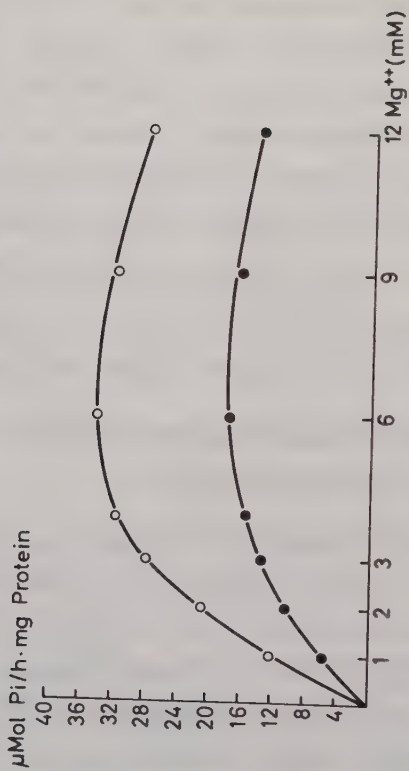


Abbildung 16: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase der mikrosomalen Subfraktion der homogenisierten *Cäcummucosa* vom Verhältnis Mg/ATP. ATP-Konzentration 3 mM. Mittelwerte für 4 Kontrollratten (dunkle Kreise) und 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (helle Kreise).

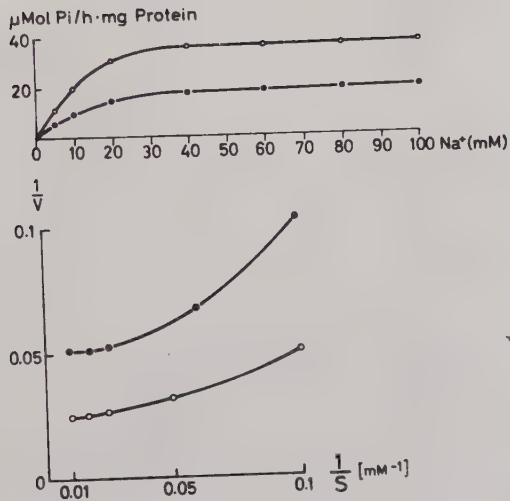


Abbildung 17: Einfluß der Na-Ionenkonzentration auf die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase einer mikrosomalen Subfraktion der homogenisierten Cäcummucosa.
 Darstellung: 17 a (oben): Spezifische Aktivität (v) versus, Natriumkonzentration (S)
 Darstellung: 17 b (unten): Lineweaver-Burk-Diagramm. Mittelwerte für 4 Kontrollratten (dunkle Kreise) und 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (helle Kreise)

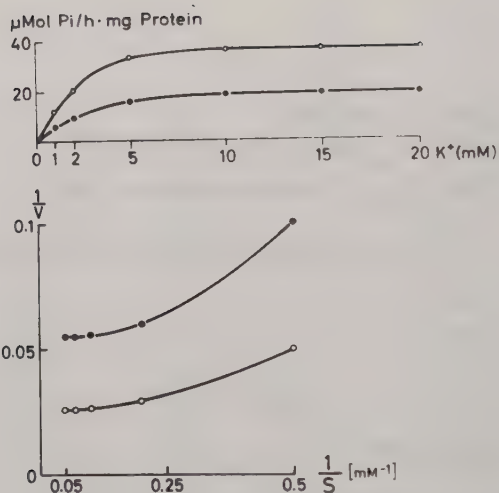


Abbildung 18: Einfluß der K-Ionenkonzentration auf die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase einer mikrosomalen Fraktion der homogenisierten Cäcummucosa.
 Darstellung: 18 a (oben): spezifische Aktivität (v) versus, Kaliumkonzentration (S)
 Darstellung: 18 b (unten): Lineweaver-Burk-Diagramm. Mittelwerte für 4 Kontrollratten (dunkle Kreise) und 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (helle Kreise).

Relative Na-K-ATPase Aktivität (%)

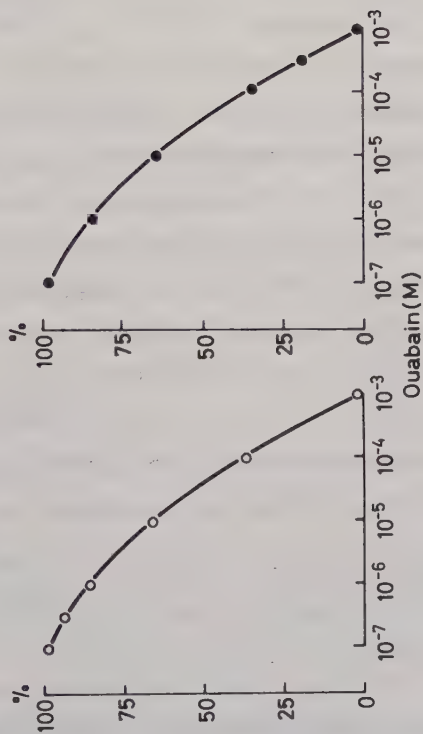


Abbildung 19: Konzentrationsabhängige Hemmwirkung von g-Strophantin (Ouabain) auf die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase einer mikrosomalen Subfraktion der homogenisierten Cäcummucosa. Mittelwerte für 4 Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (links) und 4 Kontrollratten (rechts).

Die Hillsche Gleichung (48):

$$\log \left(\frac{v}{v_{\max}} - 1 \right) = \log k_m - n \cdot \log (S)$$

beschreibt allgemein allosterische Interaktionen, wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit, $v_{\max}$ die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S die Substratkonzentration, k_m die Michaelis-Menten-Konstante und n der Hill-Koeffizient ist (26). Es wird vermutet, daß Hill-Koeffizienten zwischen 1 und 2 einen homotrop kooperativen Effekt zwischen zwei oder mehr Bindungsstellen desselben Liganden (hier Na) aufzeigen. Der Einfluß der Natriumionen auf die Enzymaktivierung könnte gemäß den Beobachtungen von Squires (117), der das kinetische Verhalten der Na-K-ATPase der Mikrosomenfraktion des Gehirns studierte, auf einem solchen Effekt beruhen.

Bei der Auftragung im Koordinatensystem $\log \left(\frac{v}{v_{\max}} - 1 \right)$ gegen $\log (S)$ ergab n als Steigung 1.2 und $\log k_m$ als Achsenabschnitt eine Michaelis-Menten-Konstante von 9 mM.

f) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Kaliumkonzentration im Inkubationsmedium

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, zeigte die K-Aktivierungskurve ein analoges kinetisches Verhalten. Der entsprechende Hill-Koeffizient betrug 1.4, die Michaelis-Menten-Konstante 1.8 mM.

g) Hemmung der Na-K-ATPase durch Ouabain

Die Untersuchungen über die Hemmung der Na-K-ATPase durch g - Strophantin sind als Dosis-Wirkungskurve in Abb. 19 dargestellt. Wir sehen eine Verminderung der Aktivität ab einer Ouabain-Konzentration von $10^{-7}M$ und eine totale Hemmung aufgrund der geringen Sensitivität der ATPase-Präparationen der Ratte in einem Bereich von $10^{-3}M$. Die halbmaximale Hemmung (I_{50}) des Enzyms durch g - Strophantin liegt sowohl für die normale als auch die hypertrophierende Schleimhaut bei $5 \cdot 10^{-5}M$.

f) Schlußfolgerungen

Eine Synopsis aller Ergebnisse ist in Tab. 6 dargestellt. Überblickt man die Befunde in ihrer Gesamtheit, so läßt sich die eindeutige Aussage machen, daß die Plasmamembranfraktionen beider Tiergruppen sich in ihrer Affinität zu den Effektoren Na, K und Mg gleich verhalten. Schließlich war auch die Empfindlichkeit gegenüber Ouabain identisch. Dagegen war die maximale Spaltungsrate von ATP (v_{max}) erheblich und zwar auf das Doppelte beschleunigt, während die halbmaximale Sättigungskonzentration für ATP (k_m) unverändert gefunden wurde. Daraus läßt sich schließen, daß die enzymkinetischen Eigenschaften der Na-K-ATPase während der Hypertrophieentwicklung unverändert bleiben. Entsprechend der oben (S. 53) ausgeführten Alternative ist demnach ein vermehrter Einbau

von qualitativ unveränderten Enzymmolekülen in die basolaterale Zellmembran am wahrscheinlichsten.

Tab. 6 Kinetische Parameter der Na-K-ATPase in der mikrosomalen Subfraktion des Rattencäcums bei Kontrollen und bei Ratten nach 7-tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol

Parameter	Kontrollen	PÄG-Tiere
Na		
k_m	9.0 mM	9.1 mM
n	1.2	1.2
K		
k_m	1.8 mM	1.8 mM
n	1.4	1.4
ATP		
k_m	0.4 mM	0.4 mM
v_{max}	18.2 μ M P_i /h $\cdot$ mg	36.4 μ M P_i /h $\cdot$ mg
Mg/ATP	2/1	2/1
I_{50}	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M
Ouabain		

Diskussion

1. Zur Methodik

Ein relativ einfaches Verfahren zur Herstellung von Homogenaten, das auch zur gleichzeitigen Gewinnung der Zellfraktionen mittels Differentialzentrifugation geeignet ist, stellt der Zellaufschluß im wäßrigen Milieu dar. Eine quantitative Gewinnung aller Zellfraktionen aus dem Homogenat ist jedoch schwierig, da sich Reinheit und quantitative Ausbeute der einzelnen Fraktionen im Grunde gegenseitig ausschließen.

Zum Zwecke der hier betriebenen Untersuchung der Na-K-ATPase war eine Anreicherung von enzymhaltigen Plasmamembranfragmenten notwendig. Demgegenüber war nicht beabsichtigt, die aus anderen Arbeiten schon bekannte Lokalisation des Enzyms an der basolateralen Zellmembran (21,35,46,85,86,119) erneut zu überprüfen, eine Reindarstellung aller Fraktionen zu erreichen oder die Plasmamembranfraktion z.B. in Fragmente der luminalen und basolateralen Zellmembran weiter aufzutrennen.

Deshalb lag das Hauptgewicht unseres Verfahrens auf einer hohen Membranausbeute, wobei ein gewisser Verlust an Membrananteilen allerdings in Kauf genommen werden mußte, um andere Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) sicher auszuschließen. Durch Verzicht auf vollständige Aufarbeitung eines groben Sediments S_1 , das noch unaufgeschlossene Zellen und größere

Zellfragmente enthielt, wurde die Ausbeute in der mikrosomalen Fraktion zwar geringer, das Verfahren insgesamt aber handlicher und sicherer. Immerhin wurden 70 % der Na-K-ATPase in der mikrosomalen Fraktion wiedergewonnen, vergleichbar mit den besten Ausbeuten anderer Untersucher (55,99,105,111).

Daß sich die Na-K-ATPase als basolateraler Plasmamembranmarker in mehr oder weniger starkem Ausmaß in sämtlichen Fraktionen findet, ist einerseits durch die relativ schonende Aufschließung, andererseits durch die strukturellen Eigenschaften der Plasmamembranen unterschiedlicher Zellen bedingt. In der mikrosomalen Fraktion der hypertrophierenden Schleimhaut war die Na-K-ATPase auf Kosten der S_1 - Fraktion (Tab. 3) trotz unverändertem Homogenisationsverfahren stärker angereichert als in der normalen Mucosa. Dies muß so sein, wenn entweder die basolateralen Membranen proliferieren oder aber dichter mit Enzymmolekülen besetzt sind. Andererseits können wir eine unterschiedliche Membranfragmentierung der wachsenden im Vergleich zur normalen Schleimhaut nicht mit Sicherheit ausschließen. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß die erwähnte Umverteilung des Enzyms von der S_1 auf die S_3 -Fraktion allenfalls einen quantitativen Faktor darstellt, da die größere spezifische Aktivität des Enzyms ja nicht nur in der mikrosomalen Fraktion, sondern auch im Gesamthomogenat eingesehen wurde.

2. Zu den Ergebnissen

2.1 Zunahme der Cäcummasse

Der Anteil des Blinddarmvolumens am Gesamtvolumen des Magen-Darm-Trakts (14) beträgt für die weiße Ratte 16 % und liegt damit zwischen dem Wert des nur Zellulose fressenden Kaninchens (31 %) und dem des Fleisch fressenden Hundes (1 %). Damit lag schon lange die Vermutung nahe, daß das Organ bei Zellulose fressenden monogastrischen Nagern als Ort des bakteriellen Zelluloseabbaus fungiert (14), wobei die entstehenden kurzkettigen Fettsäuren von der Schleimhaut resorbiert werden. Bei der omnivoren Ratte kann das Cäcum durch eine ganze Reihe diätetischer Maßnahmen (64) sowie durch Aufzucht unter keimfreien Bedingungen (3,39-41) zur Hypertrophie gebracht werden. All diesen Zuständen ist gemeinsam, daß sie mit einer Ansammlung wenig resorbierbarer Makromoleküle im Cäcumlumen und meist mit osmotisch bedingten Diarrhoen verbunden sind (52,65,66).

Polyäthylenglykol 4 000, ebenfalls ein nicht resorbierbares und experimentell leicht applizierbares Polymer, induzierte eine starke Vergrößerung des Cäcums, während andere Darmabschnitte ihren ursprünglichen Zustand bewahrten. Nach zweimonatiger PÄG-Aufnahme war die Cäcumboberfläche auf das Dreifache, das Trockengewicht des Organs auf das Doppelte zeitlinear angewachsen (68), während das Feuchtgewicht und der

Proteingehalt der Schleimhaut rascher und im Zeitverlauf abflachend auf das Doppelte zunahmen. Die quantitativ diskrepante Entwicklung dieser Parameter beruht einerseits auf Dehnungsprozessen der Cäcumwand, andererseits auf Variationen des Wassergehaltes und wahrscheinlich auch des Gehaltes an Mucopolysacchariden während des Wachstums (92).

Wie Untersuchungen des Nucleinsäuren- und Proteingehalts der Cäcummucosa unter dem Einfluß von PÄG zeigten, nehmen die Protein-, RNS- und DNS - Menge proportional zueinander zu. Dabei bleibt der Protein-, DNS - Quotient zu allen Zeiten konstant, so daß das Wachstum auf zellulärer Ebene durch Vermehrung und nicht durch Vergrößerung der Zellen geschieht (92).

Wie der Dünndarm und das Colon, resorbiert das Cäcum aber vor allem auch Natriumchlorid und Wasser. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, daß mit dem PÄG-induzierten Wachstum des Cäcums erhebliche Veränderungen der Elektrolyttransportfunktion auftraten.

2.2 Steigerung des Natriumtransportes während der Hypertrophie

Wurde der Elektrolyttransport auf die Zellmasse bezogen (Oberfläche oder Gewicht), so stiegen die mit der Methode der abgebundenen Schlinge am narkotisierten Tier in vivo gemessenen Nettoresorptionsraten von Natrium und Wasser innerhalb von 7 - 14 Tagen auf das Doppelte an. Unter der experimentellen

NATRIUMRESORPTION

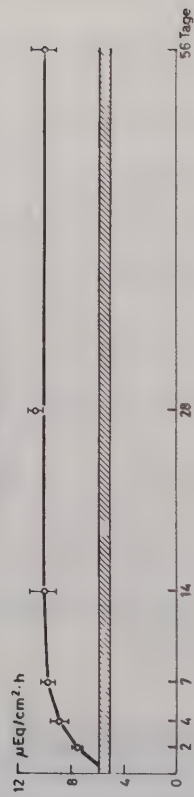


Abbildung 2o: Zunahme der Natriumresorption des Rattencäcums in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit Polyäthylenglykol. Die schraffierten Flächen geben den SEM-Bereich von Kontrolltieren an.
Nach Loeschke (69).

Bedingung des elektrochemischen Gleichgewichts war ferner die transmurale Konzentrationsdifferenz für Natrium und Chlorid signifikant erhöht. Sowohl unter der Bedingung des Nettotransportes als auch im Gleichgewicht nahm das elektrische transmurale Potential zu, wobei das Lumen um ca. 10 mV stärker negativ wurde. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, daß die schon an der normalen Cäcummucosa gegen das elektrochemische Potential gerichtete ("aktive") Natriumresorption im Zuge der Hypertrophieentwicklung weitgehend selektiv gesteigert war, da gleichzeitige Änderungen der Cl-Resorption sowie der K- und Bicarbonatsekretion quantitativ sehr viel geringer ausfielen (69,70). In diesem Zusammenhang war daher das Verhalten der Na-K-ATPase während der Hypertrophieentwicklung besonders interessant.

2.3 Zunahme der Na-K-ATPase während der Hypertrophie

Seit den Untersuchungen von Skou (111) wird das Na-K-ATPase-Enzymsystem als biochemisches Äquivalent des aktiven transmembranen Transports von Natrium und Kalium angesehen. Sein ubiquitäres Vorkommen, seine chemischen Eigenschaften und die anatomische Lokalisation führten zu der Vorstellung, daß es sich bei dem Enzym vielleicht sogar um das Translokationssystem selbst handelt, welches die Hydrolyse von ATP direkt in die vektorielle Bewegung von Natrium und Kalium gegen den elektrochemischen Gradienten umsetzt (19,47,59,82, 113-115,133).

Dabei ist schon für einfache Zellen wie den Erythrocyten oder das Tintenfischaxon unklar, inwieweit eine fixe oder variable Kopplung zwischen den einander entgegengerichteten Flüssen von Natrium und Kalium besteht. Es gibt Anhalte dafür, daß neben dem chemisch gekoppelten Natriumausstrom und Kaliumeinstrom, andere Carrier vermittelte transmembranale Natrium- und Kaliumflüsse bestehen wie z.B. ein gekoppelter Natrium-Natrium- oder Kalium-Kalium-Austausch. Die chemische Kopplung zwischen den Flüssen hängt vom Verhältnis von Natrium und Kalium in der extracellulären und intracellulären Flüssigkeit, sowie von der intracellulären Konzentration an ATP, ADP und anorganischem Phosphat ab (115).

In komplexeren Membranen wie dem Darm- oder Nierenepithel scheinen die transmuralen Nettoflüsse von Natrium und Kalium jedenfalls nicht fest aneinander gekoppelt zu sein (104). Daß die Natriumresorption während der Hypertrophieentwicklung des Cäcums quantitativ sehr viel mehr zunahm als die K-Sekretion (70), könnte hierzu passen oder steht zumindest nicht im Widerspruch zum vermuteten Zusammenhang zwischen dem Natrium- und Kaliumtransport einerseits und dem Na-K-ATPase-Enzymsystem andererseits.

Frühere Arbeiten am Gesamthomogenat der normalen und der hypertrophierenden Schleimhaut (nach 7 - 12tägiger PÄG-Exposition) hatten bereits gezeigt, daß allein der Na-K-stimulier-

bare Anteil der Mg-Na-K-ATPase einen signifikanten Anstieg der spezifischen Aktivität aufwies. Die spezifische Aktivität anderer strukturgebundener oder cytoplasmatischer Leitenzyme wie der Mg-ATPase, Glutamatdehydrogenase, alkalischen Phosphatase, Glucose-6-Phosphatase und Lactatdehydrogenase blieb dagegen unverändert (69).

Im Rahmen unserer Zeitverlaufstudien konnten wir diese Messungen der Na-K-ATPase und der Mg-ATPase nicht nur bestätigen, sondern darüber hinaus zeigen, daß sich die Steigerung der Na-K-ATPase ausschließlich an den mikrosomalen Partikeln abspielt.

2.4 Zeitliche Korrelation zwischen Na-K-ATPase und Natriumnettoresorption während der Hypertrophie

Obwohl die selektive Induktion der Na-K-ATPase bei Steigerung des aktiven transmembranen Natrium- und Kaliumtransportes ein generalisiertes biologisches Phänomen ist (8,30,45,50,53,54,57,106,120), liegen erst wenige detaillierte Befunde über eine zeitliche Korrelation dieser Parameter vor. In unseren Untersuchungen am hypertrophierenden Rattencäcum konnte durch Zeitverlaufstudien der direkte Zusammenhang von Natriumtransport und Na-K-ATPase noch weiter erhärtet werden. In der mikrosomalen Subfraktion, aber auch schon im Gesamthomogenat, zeigte die Zunahme der Na-K-ATPase einen Zeit-

verlauf, welcher demjenigen der Natriumtransportsteigerung genau parallel ging (Abb. 20). Daß dabei für die Enzymbestimmung der Proteingehalt, für den Transport dagegen die Oberfläche als Bezugsparameter dienten, ist insofern unerheblich, als sich die Relation Oberfläche : Protein während des Wachstums nicht änderte (69). Wir sehen in dieser strikten zeitlichen Parallelität zwischen der Steigerung von Natriumtransport und der Zunahme der Na-K-ATPase ein neues starkes Indiz für eine enge funktionelle Identität des aktiven Na/K-Transportes und der Na-K-ATPase zumindest im Cäcum.

2.5 Mechanismen der Aktivitätssteigerung der Na-K-ATPase

Die höhere Aktivität der Na-K-ATPase in der hypertrophierenden Mucosa könnte einmal durch eine Modifikation der Eigenschaften des Enzymmoleküls mit geänderter Kinetik, zum anderen durch eine größere Molekülzahl pro Zellmasse hervorgerufen sein.

a) Modifikation der Eigenschaften des Enzymmoleküls

Es besteht weitgehende Einigkeit darin, daß Regulationen der biologischen Aktivität von Proteinen durch spezifische Modifikationen ihrer Struktur erfolgen können. Diese Konformationsänderungen können Folge allosterischer Mechanismen, desweiteren durch kovalente Modifikationen der Proteinseitenketten, aber auch durch Alteration der Primärstruktur be-

dingt sein.

Für die Na-K-ATPase des Cäcums kam eine Modifikation der Eigenschaften des Enzymmoleküls umso mehr in Betracht, als die sigmoidale Form der Aktivationskurven durch Na und K eine allosterische Kontrolle des katalytischen Zentrums des Enzymmoleküls, hervorgerufen durch Liganden-abhängige Konformationsänderung des Moleküls, vermuten läßt. Da sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Hill-Koeffizienten für die normale und hypertrophierende Mucosa zeigten, erscheint die Hypothese, daß das Enzym in der stimulierten Mucosa in einer differentiellen allosterischen Form mit veränderter Affinität vorliege, unwahrscheinlich. Diese in-vitro Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, daß in-vivo Änderungen des aktiven Ionentransportes durch allosterische Enzymaktivierung bei veränderter Verteilung dieser Ionen in der extracellulären und intracellulären Flüssigkeit erfolgen können. Über die Na- bzw. K-Konzentration dieser Kompartimente beim Kontrolltier bzw. PÄG-behandeltem Tier ist lediglich bekannt, daß die Serumkonzentration von Natrium bei letzteren höher liegt, was als Folge der durch PÄG hervorgerufenen geringen Dehydratation aufgefaßt wurde (68). Die K-Konzentration im Serum unterschied sich in beiden Kollektiven nicht (68). Intracelluläre Ionenkonzentrationen in der Cäcumschleimhaut wurden bisher nicht gemessen.

b) Veränderungen der Membranstruktur

Daß die qualitativen Eigenschaften des Enzymmoleküls gegenüber ATP, Na, K und Mg unverändert und die maximale Umsatzrate von ATP (Abb. 16) gesteigert ist, läßt zwei Deutungsmöglichkeiten zu: Die erhöhte $v_{\max}$ könnte entweder auf einen dichteren Besatz der basolateralen Membranen mit Enzymmolekülen beruhen oder aber, die Oberfläche der basolateralen Membran selbst könnte sich bei unveränderter Molekülzahl vergrößern.

Daß eine Proliferation der basolateralen Zellmembran in biologischen Membransystemen prinzipiell möglich ist, zeigt die nach Salzbelastung hypertrophierende Salzdrüse mariner Vögel. Bereits in den ersten 24 Stunden der adaptativen Organvergrößerung zeigen sich verstärkte basale Einfaltungen und mit Zunahme der Hypertrophie eine Oberflächenvergrößerung der lateralen und basalen Membranen der sekretorischen Drüsen (25,29). Im Fall der stimulierten Cäcummucosa spricht gegen eine Proliferation des basolateralen Labyrinths, daß die spezifische Enzymaktivität auch in der mikrosomalen, die Plasmamembranen ohnehin angereichert enthaltenen Subfraktion erhöht war und es nicht, wie es an der Niere Methylprednisolon-behandelter Ratten der Fall ist (76), zu einer selektiven Erhöhung der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase nur im Gesamthomogenat, nicht hingegen in der

Plasmamembranfraktion kam. Auch in histologischen und elektronenoptischen Präparaten von Polyäthylenglykol-behandelten Tieren ließ eine vorläufige Auswertung keine Membranproliferation erkennen (72), allerdings wäre hier zusätzlich ein zellmorphometrischer Beleg erforderlich.

Obwohl wir aufgrund der jetzigen Befunde eine Proliferation der basolateralen Zellmembranen nicht sicher ausschließen können, erfolgt der erhöhte Natriumtransport am hypertrophierenden Cäcum sehr viel wahrscheinlicher aufgrund eines dichteren Besatzes der basolateralen Zellmembranen mit Na-K-ATPase-Molekülen. Dies wäre Prozessen an einigen anderen, den Natriumtransport adaptativ regulierenden Epithelien analog. Nachdem sich in histologischen Präparaten der kompensatorisch hypertrophierenden Niere keine Hinweise auf eine Proliferation der basolateralen Membranen der distalen Tubuli ergab (100), wurde auch hier eine pro Zellmembranfläche erhöhte Molekülzahl als Ursache der induktiven Veränderungen der Na-K-ATPase diskutiert. Dazu passte, daß die spezifische Aktivität des Enzyms nicht nur im Gesamthomogenat, sondern - im Gegensatz zur Aktivitätserhöhung nach Methylprednisolon (76) - auch in der mikrosomalen Fraktion gemessen wurde, wobei dieses Verhalten der Na-K-ATPase selektiv war, da sich die spezifischen Aktivitäten anderer plasmamembrangebundener Enzyme unverändert zeigten (27,59). Auch die erhöhte spezifische Na-K-ATPase-Aktivität der Chlorid-

zellen in den Kiemen euryhaliner Fische könnte durch einen vermehrten Einbau von Na-K-ATPase bedingt sein, da im Verlaufe der Adaptation lediglich das ATPase-spezifische Enzymprotein in sonst unveränderten Zellmembranen erhöht war (99).

2.6 Analogien zur funktionellen Hypertrophie anderer elektrolyttransportierender Epithelien

Die Ergebnisse am hypertrophierenden Cäcum zeigen eine sehr auffällige Ähnlichkeit mit Befunden, die an anderen, den Elektrolyttransport adaptativ regulierenden Epithelien erhoben wurden. So erhöhte sich am Colon von Ratten nach kaliumreicher Diät die Nettosekretion von Kalium, wobei das Lumen elektrisch stärker negativ wurde. Auch hier war die Adaptation der Kaliumsekretion und die Induktion der Na-K-ATPase auf das Colon beschränkt und im Dünndarm nicht nachweisbar (8,107). Die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase verdoppelte sich, wobei sich ähnlich wie in unseren Untersuchungen kinetische Studien mit der mikrosomalen Fraktion eine unveränderte Affinität zu Kalium zeigten (8). Im hypertrophierten Cäcum keimfreier Ratten war wie nach Polyäthylenglykol-induzierter Hypertrophie die Nettoresorption von NaCl und Wasser erhöht (67), die Gleichgewichtskonzentration von Natrium erniedrigt (79) und die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase im Gesamthomogenat gesteigert (108).

Kinetische Untersuchungen der erhöhten Enzymaktivität sind in diesem Modell bisher nicht erfolgt.

Während man vom Ileum des Menschen nur weiß, daß nach Colektomie und Jejunumresektion der natriumgekoppelte Wassertransport pro cm Länge und zugleich die Zellzahl zunimmt (93,131,132,135,136), wurde bei der Ratte eine höhere spezifische Aktivität der Na-K-ATPase im Schleimhauthomogenat des Ileums nach Jejunektomie gefunden (123). Dies sind die einzigen uns bekannten Hinweise auf eine funktionelle Adaptation des intestinalen Natrium- und Kaliumtransportsystems beim warmblütigen Tier.

Regional verschiedene Adaptationsprozesse innerhalb eines subspezialisierten Organs wurden nach Resektionsprozeduren auch für die Niere und die Leber des Warmblüters gefunden. So kommt es in der Niere sowohl nach unilateraler Nephrektomie als auch nach subtotaler Resektion zur kompensatorischen Hypertrophie des restlichen Nierengewebes. Dabei erhöhen sich der Natriumnettotransport pro Gewichtseinheit und die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase innerhalb von 2-3 Wochen etwa zeitparallel zueinander (58). Die Induktion der Na-K-ATPase ist im distalen Tubulus um ein Vielfaches stärker als im proximalen (100). Auch nach partieller Leberresektion kommt es zu einer Zunahme des Kationenflusses und der Aktivität der Na-K-ATPase pro Trockengewicht, wobei sich die erhöhte Enzymaktivität auch histochemisch in den Zellmembranen der

Gallencanaliculi der regenerierenden Leber nachweisen läßt (5).

Adaptative Veränderungen der Zellfunktion und der Zellmasse als reversible Reaktion auf neue Umweltbedingungen sind auch für die Salzdrüse mariner Vogelarten und die Chloridzellen der Kiemen euryhaliner Fische gesichert. Gewisse Vogelarten, die sowohl im Salz- als auch im Süßwassermilieu leben können, besitzen paranasal eine Drüse, die, wird dem Vogel statt Leitungswasser hypertone Natriumchloridlösung angeboten, eine natriumchloridhaltige Flüssigkeit abzusondern beginnt. Bei längerdauernder Zufuhr erhöht sich das Drüsengewicht, die Sekretionsrate pro Gewichtseinheit und die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase. Sowohl die Erhöhung der aktiven Transportrate als auch der Na-K-ATPase ist nach etwa 10 Tagen voll entwickelt (28,33,49). Ebenso wie die Salzdrüse der marinen Vögel stehen auch die Chloridzellen der Kiemen im Dienste der Salzwasserregulation. Meerwasser ausgesetzte Süßwasserarten euryhaliner Knochenfische zeigen eine erhöhte branchiale Natriumexkretion, eine Zunahme der Chloridzellen und eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase parallel zu der Differenz der Natriumkonzentration des externen und internen Milieus (57,63).

2.7 Steuerung des Adaptationsprozesses

Die Mechanismen, die bei allen erwähnten Bedingungen zur Adaptation führen, sind trotz zahlreicher Modellvorstellungen nicht hinreichend geklärt.

Bezüglich des Cäcums wäre z.B. denkbar, daß die nach PÄG-Fütterung beobachtete osmotische Diarrhoe zu einem größeren Anfall von Elektrolyten aus dem Dünndarm führt, so daß ein vermehrtes Natriumangebot vom Lumen her im Cäcum besteht, was dann mit einer vermehrten Resorption beantwortet würde. So geht auch bei der Aktivitätssteigerung der Na-K-ATPase bei der kompensatorischen Hypertrophie der Niere (44,130), des Dünndarms (131) und der Salzdrüse mariner Vogelarten (50) ein erhöhtes Natriumangebot voraus. Das vermehrte Natriumangebot an das Cäcum müßte dann allerdings zu einer so starken Natriumresorptionssteigerung führen, daß die intraluminale Natriumkonzentration - wie in vivo gemessen (68) - bei den PÄG-Tieren unter die bei Kontrolltieren gefundenen Werte sinkt. Die erhöhte Enzymaktivität könnte somit durch eine Vermehrung des vorhandenen Substrates (Substratinduktion) bewirkt werden. Ein schon bekanntes Beispiel für eine derartige diätetische Manipulierbarkeit eines intestinalen Enzyms ist das Verhalten der Disaccharidaseaktivität des Dünndarmbürstensaumes der Ratte. Bei fastenden Ratten steigt nämlich die spezifische Aktivität der Saccharase und Maltase selektiv dann an, wenn eine kohlenhydratreiche Diät gefüttert wird (20).

Als weitere mögliche Ursache einer vermehrten Enzymaktivität ist für andere Epithelien, deren Elektrolyttransport adaptativen Einflüssen unterliegt, eine hormonelle Steuerung der Enzyminduktion insbesondere durch die Hypophyse und die Nebenniere immer wieder vermutet worden (15,74,88,101,124). Generell konnte ein hormoneller Einfluß auf den intestinalen Elektrolyttransport bereits für verschiedene Darmabschnitte nachgewiesen werden. So steigert z.B. Desoxycorticosteron im Ileum der Ratte den natriumgekoppelten Wassertransport, die Zottenlänge und Zellmigrationsrate (124), ferner im Colon die Nettotransportrate für Natrium und Kalium sowie die transmurale Potentialdifferenz und in beiden Darmabschnitten parallel zu den Veränderungen des Elektrolyttransportes selektiv die Aktivität der Na-K-ATPase (16).

Darüber hinaus wurde eine Steigerung der Na-K-ATPase und des Natriumtransportes, sowie z.T. auch der Organmasse durch Methylprednisolon im Jejunum, Ileum und Colon der Ratte (16), ferner durch Angiotensin im Colon (42,51) und durch die Schilddrüsenhormone im Dünndarm beschrieben (121,129). Vermutungen, daß die am Cäcum beobachteten Adaptationsprozesse hormonell vermittelt sein könnten, haben sich jedoch nicht bestätigt. Experimentelle Manipulationen des endokrinen Status der Tiere erbrachten zwar einen eindeutigen Einfluß hormoneller Faktoren auf den Natriumtransport des Cäcums: Das Transportniveau wurde durch akute Überschußdosen von Aldosteron erhöht und durch bilaterale Adrenalektomie, Hypophysektomie oder extra-

celluläre Volumenexpansion erniedrigt. Dies betraf die normale und hypertrophierende Schleimhaut jedoch in quantitativ gleichem Ausmaß und hob die Transportdifferenz nicht auf, so daß die Hormone nicht kausal, sondern allenfalls modifizierend in den Adaptationsvorgang eingreifen (71).

Zweifellos kommen auch nur lokal wirksam werdende Mechanismen wie organspezifische humorale Stimulatoren oder umgekehrt eine Reduktion organspezifischer Inhibitoren der Na-K-ATPase (116) als Vermittler der Aktivitätssteigerung in Betracht, doch liegen für das Cäcum bisher keine entsprechenden Untersuchungen vor. Als einziger lokaler Mechanismus konnte ein direkter chemisch-physikalischer Effekt von Polyäthylenglykol auf das Transportsystem ausgeschlossen werden. Durch Präinkubation mit Cäcumüberstand oder der ursprünglichen Trinkflüssigkeit konnte kurzfristig kein Effekt erzielt werden (69). In Übereinstimmung dazu steht auch die Beobachtung, daß auch Polyäthylenglykol 300 die Na-K-ATPase in vitro nicht stimulierte (116).

Zusammenfassung

Am Cäcum erwachsener Ratten konnte durch Zusatz des Polymers Polyäthylenglykol zum Trinkwasser nachgewiesen werden, daß die intestinale Salzwasserresorption von Warmblütern außer über eine Variation der Zellmasse auch über eine Funktionsänderung der epithelialen Einzelzelle diätetisch stimuliert werden kann (69). Dieses Modell eines intestinalen Adaptationsprozesses des Elektrolyttransportes schien uns geeignet, detailliertere Daten über die induktiven Veränderungen der Na-K-ATPase zu gewinnen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden daher Änderungen der spezifischen Aktivität und der Kinetik der Na-K-ATPase in der isolierten Mucosa in Abhängigkeit von der Dauer des Diätreizes untersucht.

1. Als Parameter der Gesamtgewebssmasse wurde das Feuchtgewicht und der Proteingehalt der Mucosa bestimmt. Gegenüber den Werten Leitungswasser-trinkender Kontrolltiere nahmen beide Größen innerhalb von 2 Monaten auf das Doppelte zu. Die subzelluläre Verteilung des Proteins, ausgedrückt in Prozent des Gesamthomogenats, erfuhr während der Hypertrophieentwicklung keine Veränderung.
2. Im Vergleich zur normalen Cäcummucosa wies die nach PÄG hypertrophierende Cäcumschleimhaut eine um 170 - 200 % höhere spezifische Aktivität der Na-K-ATPase auf. Dies wurde sowohl im Gesamthomogenat als auch in einer plasma-

membranreichen, mikrosomalen Subfraktion der Schleimhaut gefunden. Dabei entsprach der Zeitverlauf der Aktivitätszunahme genau demjenigen, der früher für die Steigerung der Natrium- und Volumennettoresorption pro Gewebsmasse gefunden wurde. Dies stellt ein neues, starkes Indiz für eine enge funktionelle Verknüpfung zwischen Na-K-ATPase und Natriumtransport im Cäcum dar.

3. Die spezifische Aktivität der Mg-ATPase änderte sich während der Hypertrophieentwicklung weder im Gesamthomogenat noch in den subzellulären Fraktionen.
4. Die Steigerung der Enzymaktivität der Na-K-ATPase spielte sich nach den in den subzellulären Fraktionen erhaltenen Ergebnissen ausschließlich an den Plasmamembranen ab.
5. Kinetische Untersuchungen der Na-K-ATPase zeigten, daß die höhere spezifische Aktivität auf einer erhöhten maximalen Umsatzrate von ATP beruht, während die halbmaximale Sättigungskonzentration des Enzyms für ATP und die Affinität zu den Effektoren Mg, Na und K unverändert blieben.
6. Die Enzyminduktion ging offenbar auf einen vermehrten Einbau von Enzymmolekülen in die basolaterale Zellmembran und nicht auf eine Membranvermehrung pro Zelle zurück.

7. Die Änderungen am Cäcum weisen eine große phänomenologische Ähnlichkeit mit Prozessen an anderen den Natriumtransport adaptativ regulierenden Epithelien - wie der Warmblüterniere und der Salzdrüse mariner Vogelarten - auf. Die zur Adaptation führenden Mechanismen sind ungeklärt.

Literaturverzeichnis

- 1 Albers, R.W., Koval, G.J., Swann, A.C.:
 Analysis of Na, K and nucleotide interactions in terms
 of a heterotropic relaxation model for (NaK) ATPase
 Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 268 (1974)
- 2 Altmann, G.G., Lebloud, C.P.:
 Factors influencing villus size in the small intestine
 of adult rats as revealed by transposition of intestinal
 segments.
 Amer. J. Anat. 127 , 15 (1970)
- 3 Asano, T.:
 Modification of cecal size in germfree rats by long-
 term feeding of anion exchange resin.
 Amer. J. Physiol. 217 , 911 (1969)
- 4 Asano, Y., Tashima, Y., Matsui, H., Nagano, K., Nakao, M.:
 (Na-K)-ATPase from the frog bladder and its relation-
 ship to sodium transport.
 Biochim. Biophys. Acta 219 , 169 (1970)
- 5 Bakkeren, J.A.J.M., Bonting, S.L.:
 Studies on (Na-K)-activated ATPase: XXI Changes in
 (Na-K)-activated ATPase activity and ouabain-sensitive
 86 Rb - uptake rate in regenerating rat liver.
 Biochim. Biophys. Acta 150 , 467 (1968)
- 6 Bakkeren, J.A.J.M., v.d. Beek, J.A.C.M., Bonting, S.L.:
 Studies on sodium-potassium activated adenosine-tri-
 phosphatase XXIX. Daily rhythmic changes in sodium-
 potassium activated adenosine-triphosphatase activities
 in rat liver and kidney.
 Pflügers Archiv 325 , 77 (1971)
- 7 Bartlett, G.R.:
 Phosphorus assay in column chromatography.
 J. biol. Chem. 234 , 466 (1959)
- 8 Bastl, C., Fisher, K., Binder, H.J., Hayslett, J.P.:
 Colonic function during potassium loading and in renal
 insufficiency.
 VI. Intern. Congress of Nephrol., Florenz 1975, R 250

- 9 Beck, I.T., Dinda, P.K.:
Sodium and water transport across the jejunum of fasted rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 51 , 105 (1973)
- 10 Bolin, T.D., Pirola, R.C., Davis, A.E.:
Adaptation of intestinal lactase in the rat.
Gastroenterology 51 , 406 (1969)
- 11 Du Bois, D.P., Potter, V.R.:
The assay of animal tissues for respiratory enzymes: III. Adenosinetriphosphatase
J. biol. Chem. 150 , 185 (1943)
- 12 Bonting, S.L., Simon, K.A., Hawkins, N.M.:
Studies on sodium potassium-activated adenosine-tri-phosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat.
Arch. Biochem. 95 , 416 (1961)
- 13 Bonting, S.L., Caravaggio, L.L.:
Studies sodium-potassium-activated adenosine-tri-phosphatase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues.
Arch. Biochem. 101 , 37 (1963)
- 14 Buddenbrock, W.v.:
Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere.
In: Vergleichende Physiologie, Band III
Birkhäuser, Basel - Stuttgart (1954)
- 15 Charney, A.N., Silva, P., Besarab, A., Epstein, F.H.:
Separate effects of aldosterone, DOCA and methylprednisolone on renal Na-K-ATPase.
Am. J. Physiol. 227 , 345 (1974)
- 16 Charney, A.N., Kinsey, D., Myers, L., Gianella, R.A., Gots, R.E.:
Na-K-activated adenosine triphosphatase and intestinal electrolyte transport. Effect of adrenal steroids.
J. Clin. Invest. 56 , 653 (1975)

- 17 Charnock, J.S., Cook, D.A., Opitt, L.J.:
Role of energized states of (Na+K)-ATPase in the sodium pump.
Nature New Biology 233 , 171 (1971)
- 18 Chipperfield, A.R., Whittam, R.:
Evidence that ATP is hydrolysed in a one-step reaction of the sodium pump.
Proc. R. Soc. London B 187 , 269 (1974)
- 19 Dahl, J.L., Hokin, L.E.:
The sodium-potassium adenosinetriphosphatase.
Ann. Rev. Biochem. 43 , 327 (1974)
- 20 Deren, J.J., Broitman, S.A., Zamcheck, N.:
Effect of diet upon intestinal disaccharidases and disaccharide absorption.
J. clin. Investig. 46 , 186 (1967)
- 21 Douglas, A.P., Kerley, R., Isselbacher, K.J.:
Preparation and characterization of the lateral and basal plasma membranes of the rat intestinal epithelial cell.
Biochem. J. 128 , 1329 (1972)
- 22 Dowling, R.H., Booth, C.C.:
Structural and functional changes following small intestinal resection in the rat.
Clin. Sci. 32 , 139 (1967)
- 23 Dunham, E.T., Glynn, I.M.:
Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali ions.
J. Physiol. 156 , 274 (1963)
- 24 Ekstroem, K.E., Benevenga, N.J., Grummer, R.H.:
Effects of diets containing dried whey on the lactase activity of the small intestinal mucosa and the contents of the small intestine and cecum of the pig.
J. Nutr. 105 , 851 (1975)

- 25 Ellis, R.A., Goertemiller, C.C., Jr., De Lelis, R.A., Kablotsky, Y.H.:
The effect of salt water regimen on the development of the salt glands of domestic ducklings.
Developm. Biol. 8 , 286 (1963)
- 26 Endrenyi, L., Fajsz, C., Kwong, F.H.F.:
Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known.
Eur. J. Biochem. 51 , 317 (1975)
- 27 Epstein, F.H., Silva, P.:
Role of sodium, potassium ATPase in renal function.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 519 (1974)
- 28 Ernst, S.A., Goertemiller, C.C., Jr., Ellis, R.A.:
The effect of salt regimens on the development of (Na-K)-dependent ATPase activity during the growth of salt glands of ducklings.
Biochim. Biophys. Acta 135 , 682 (1967)
- 29 Ernst, S.A., Ellis, R.A.:
The development of surface specialization in the secretory epithelium of the avian salt gland in response to osmotic stress.
J. Cell. Biol. 40 , 305 (1969)
- 30 Fanestil, D.D.:
Renal Na-K-ATPase relationship to total function renal mass.
Nature 218 , 176 (1968)
- 31 Farias, R.N., Bloj, B., Morero, R.D., Sineriz, F., Trucco, R.E.:
Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition.
Biochim. Biophys. Acta 415 , 231 (1975)
- 32 Fiske, C.H., Subbarow, Y.:
The colorimetric determination of phosphorus.
J. biol. Chem. 66 , 375 (1925)

- 33 Fletcher, G.L., Stainer, I.M., Holmes, W.N.:
Sequential changes in the adenosinetriphosphatase activity and the electrolyte excretory capacity of the nasal glands of the duck (*Anas platyrhynchos*) during the period of adaptation to hypertonic saline.
J. Exp. Biol. 47 , 375 (1967)
- 34 Folin, O., Ciocalteu, V.:
On tyrosine and tryptophane determination in proteins.
J. biol. Chem. 73 , 627 (1927)
- 35 Fujita, M., Ohta, H., Kawai, K., Matsui, H., Nakao, M.:
Differential isolation of microvillus and basolateral plasma membranes from rat intestinal mucosa: mutually exclusive distribution of digestive enzymes and ouabain-sensitive ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 274 , 336 (1972)
- 36 Garrahan, P.J., Glynn, I.M.:
The incorporation of inorganic phosphate into adenosine triphosphate by reversal of the sodium pump.
J. Physiol. 192 , 237 (1967)
- 37 Gatt, S., Racker, E.:
Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism: I. Crabtree effect in reconstructed systems.
J. biol. Chem. 234 , 1015 (1959)
- 38 Gleeson, M.H., Cullen, J., Dowling, R.H.:
Intestinal structure and function after small bowel by-pass in the rat.
Clin. Sci. 43 , 731 (1972)
- 39 Gordon, H., Wagner, M., Westmann, B.S.:
Characteristics of the germfree rat.
Acta anat. 64 , 367 (1966)
- 40 Gordon, H., Pesti, L.:
The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships.
Bact. Rev. 35 , 390 (1971)

- 41 Gustafsson, B.E., Maunsbach, A.B.:
Ultrastructure of the enlarged cecum in germfree rats.
Z. Zellforsch. 120 , 555 (1971)
- 42 Gutman, Y., Shamir, Y., Glushevitzky, D., Hochman, S.:
Angiotensin increases microsomal (Na-K)-ATPase
activity in several tissues.
Biochim. Biophys. Acta 273 , 401 (1972)
- 43 Hafkenschied, J.C.M.:
Occurrence and properties of a (Na-K)-activated ATPase
in the mucosa of the rat intestine.
Pflügers Arch. 338 , 289 (1973)
- 44 Hayslett, J.P., Kashgarian, M., Epstein, F.H.:
Functional correlates of compensatory renal hypertrophy.
J. Clin. Investig. 47 , 774 (1968)
- 45 Hayslett, J.P., Jampol, L.M., Forrest, J.N., Epstein,
M., Murdaugh, H.V., Myers, J.D.:
Role of Na-K-ATPase in the renal reabsorption of
sodium in the elasmobranch (*Squalus Acanthias*).
Comp. Biochem. Physiol. 44 A 417 (1973)
- 46 Herzer, R., Merker, H.J., Denhart, R., Haberich, F.J.:
Resorptions- und Sekretionsstudien am Darm. IV. Die
Bedeutung der Interzellularspalten für den Nettoflüs-
sigkeitstransport am Dickdarm mit gleichzeitigem bio-
chemischen Nachweis von ATPase (Rattenversuche).
Z. Ges. Exptl. Med. 152 , 8 (1970)
- 47 Hilden, S., Hokin, L.E.:
Active potassium transport coupled to active sodium
transport in vesicles reconstituted from purified
sodium and potassium ion-activated adenosine tri-
phosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias*.
J. biol. Chem. 250 , 6296 (1975)
- 48 Hill, A.V.:
The possible effects of the aggregation of the mole-
cules of haemoglobin on its dissociation curves.
J. Physiol. 40 , iv (1910)

- 49 Holmes, W.N., Stewart, D.J.:
Changes in the nucleic acid and protein composition of the nasal glands from the duck (*Anas platyrhynchos*) during the period of adaptation to hypertonic saline. *J. Exp. Biol.* 48 , 509 (1968)
- 50 Holmes, W.N.:
Regulation of electrolyte balance in marine birds with special reference to the role of the pituitary-adrenal axis in the duck (*Anas platyrhynchos*).
Fed. Proc. 31 , 1587 (1972)
- 51 Hornych, A., Meyer, P., Milliez, P.:
Angiotensin, vasopressin and cyclic AMP: effects on sodium and water fluxes in rat colon.
Am. J. Physiol. 224 , 1223 (1973)
- 52 Hoskins, L.C. Zamcheck, N.:
Bacterial degradation of gastrointestinal mucins:
I. Comparison of mucus constituents in the stools of germ-free and conventional rats.
Gastroenterology 54 , 210 (1968)
- 53 Jampol, L.M., Epstein, F.H.:
Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase and osmotic regulation by fishes.
Am. J. Physiol. 218 , 607 (1970)
- 54 Joergensen, P.L.:
Dissoziation between compensatory renal growth and induction of (Na+K) ATPase in rat kidney after uninephrectomy.
Experientia 27 , 527 (1971)
- 55 Joergensen, P.L., Skou, J.Ch., Solomonson, L.P.:
Purification and characterization of (Na+K)-ATPase II. Preparation by zonal centrifugation of highly active (Na-K)-ATPase from the outer medulla of rabbit kidneys.
Biochim. biophys. Acta 233 , 381 (1971)
- 56 Joergensen, P.L.:
Isolation and characterization of the components of the sodium pump.
Quart. Rev. Biophys. 7 , 239 (1975)

- 57 Kamiya, M.:
Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase
in isolated chloride cells from eel gills.
Comp. Biochem. Physiol. 43 B , 611 (1972)
- 58 Katz, A.I., Epstein, F.H.:
The role of sodium-potassium-activated adenosine tri-
phosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney.
J. clin. Invest. 46 , 1999 (1967)
- 59 Katz, A.I., Epstein, F.H.:
Physiological role of sodium-potassium activated
adenosine triphosphatase in the transport of cations
across biologic membranes.
New England Journal of Medicine 278 , 253 (1968)
- 60 Kinne, R., Kinne-Saffran, E.:
Isolierung und enzymatische Charakterisierung einer
Bürstensaumfraktion in der Rattenniere.
Pflügers Arch. 308 , 1 (1969)
- 61 Kinne, R., Schmitz, J.E., Kinne-Saffran, E.:
The localization of the Na-K-ATPase in the cells of rat
kidney cortex. A study on isolated plasma membranes.
Pflügers Arch. 329 , 191 (1971)
- 62 Koshland, D.E. Jr., Nemethy, G., Filmer, D.:
Comparison of experimental binding data and theoretical
models in proteins containing subunits.
Biochemistry 5 , 365 (1966)
- 63 Lassere, P.:
Increase of (Na+K)-dependent ATPase activity in gills
and kidneys of two euryhaline marine teleosts,
Crenimugil Labrosus and Dicentrarchus Labrax, during
adaptation to fresh water.
Life Sci. 10 , 113 (1971)
- 64 Leegwater, D.C., De Groot, A.P., Kalmthout-Kuyper, M.:
The aetiology of caecal enlargement in the rat.
Fd. Cosmet. Toxicol. 12 , 687 (1974)

- 65 Lindstedt, G., Lindstedt, S., Gustaffson, B.E.:
Mucus in intestinal contents of germfree rats.
J. exp. Med. 121 , 201 (1963)
- 66 Loeschke, W.J.:
Protein and carbohydrate composition of cecal contents
of gnotobiotic rats and mice.
Proc. Soc. exp. Biol. 128 , 195 (1968)
- 67 Loeschke, K., Gordon, H.A.:
Water movement across the cecal wall of the germfree rat.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 133 , 1217 (1970)
- 68 Loeschke, K., Uhlich, E., Halbach, R.:
Cecal enlargement combine with sodium transport
stimulation in rats fed polyethylene glycol.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142 , 96 (1973)
- 69 Loeschke, K., Uhlich, E., Kinne, R.:
Stimulation of sodium transport and Na-K-ATPase
activity in the hypertrophing rat cecum.
Pflügers Arch. 346 , 233 (1974)
- 70 Loeschke, K.:
Adaptative Änderungen von Resorptionsvorgängen, speziell
des Natriumtransports, an einem hypertrophierenden Darm-
abschnitt.
Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München (1974)
- 71 Loeschke, K., Müller, O.A.:
Hormones and the stimulated sodium transport in cecum
hypertrophy.
Pflügers Arch. 355 , 273 (1975)
- 72 Loeschke, K., Bentzel, C.J., Kiefhaber, P., Moritz, K.:
Unveröffentlichte Befunde
- 73 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurements with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193 , 265 (1951)

- 74 Maetz, J.:
Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water
and sea water.
Phil. Trans. Roy. Soc. London B 262 , 209 (1971)
- 75 Maetz, J.:
Aspects of adaptation to hypo-osmotic and hyper-osmotic
environment
In: Biochemical and biophysical perspectives in marine
biology.
Vol. 1, p. 1. Eds. Malins, D.C., Sargent, J.R.:
Academic Press, London 1974
- 76 Manitiuss, A., Bensch, K., Epstein, F.H.:
(Na-K) activated ATPase in kidney cell membranes of
normal and methylprednisolone-treated rats.
Biochim. biophys. Acta. 150 , 563 (1968)
- 77 Moller, O.J.:
Activation by freezing of (Na+K) ATPase in a microsomal
fraction from ox kidney cortex.
Exptl. Cell Res. 68 , 347 (1971)
- 78 Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P.:
On the nature of allosteric transitions: plausible model.
J. Mol. Biol. 12 , 88 (1965)
- 79 Nakamura, S., Gordon, H.A.:
Threshold levels of NaCl upholding solute-coupled water
transport in the cecum of germfree and conventional rats.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142 , 1336 (1973)
- 80 Nicholson, J.A., Mc Carthy, D.M., Kim, Y.S.:
The responses of rat intestinal brush border and cytosol
peptide hydrolase activities to variation in dietary
protein content.
J. clin. Invest. 54 , 890 (1974)
- 81 Nygaard, K.:
Resection of the small intestine in rats.
Acta chir. scand. 133 , 233 (1967)

- 82 Van Os, C.H., Slegers, J.F.G.:
Correlation between (Na-K) activated ATPase activities
and the rate of isotonic fluid transport of gallbladder
epithelium.
Biochim. biophys. Acta 241 , 89 (1971)
- 83 Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R., Albright, C.D.:
Membrane adenosine triphosphatase as a participant in
the active transport of sodium and potassium in human
erythrocyte.
J. biol. Chem. 235 , 1796 (1960)
- 84 Post, R.L., Taniguchi, K., Toda, G.:
Synthesis of adenosine triphosphat by Na K ATPase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 80 (1974)
- 85 Quigley, J.P., Gotterer, G.S.:
Distribution of (Na-K)-stimulated ATPase activity in rat
intestinal mucosa.
Biochim. biophys. Acta 173 , 456 (1969)
- 86 Quigley, J.P., Gotterer, G.S.:
Properties of a high specific activity, (Na-K) stimulated
ATPase from rat intestinal mucosa.
Biochim. biophys. Acta 173 , 469 (1969)
- 87 Quigley, J.P., Gotterer, G.S.:
A comparison of the (Na-K)-ATPase activities found in
isolated brush border and plasma membrane of the rat
intestinal mucosa.
Biochim. biophys. Acta 255 , 107 (1972)
- 88 Reiter, R.J.:
The endocrines and compensatory renal enlargement.
In: Compensatory renal hypertrophy, p. 183
Eds. Nowinsky, W.W., Gross, R.J., Academic Press,
New York-London 1969
- 89 Repke, K.R.H., Schön, R.:
Flip-flop model of energy interconversion by ATP
synthetase.
Acta biol. med. germ 33 , K 27 - K 38 (1974)

- 90 Repke, K.R.H., Dittrich, F., Schön, R.:
Chemical reaction mechanism for ATP synthesis and
hydrolysis by ATP synthetase.
Acta biol. med. germ. 33 , K 39 - K 47 (1974)
- 91 Repke, K.R.H., Schön, R., Henke, W., Schönfeld, W.,
Streckenbach, B., Dittrich, F.:
Experimental and theoretical examination of the flip-
flop model of (Na, K)-ATPase function.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 203 (1974)
- 92 Resch, W.:
Untersuchungen über den Nucleinsäuren- und Proteingehalt von Mucosazellen bei der "funktionellen" Hypertrophie des Rattencäcums.
Inaug. Diss., Med. Fak. Univ. München 1974
- 93 Ricour, C., Millot, M., Bulan, S.:
Sodium conservation after total or sub-total colonic resection in children.
Scan. J. Gastroent. 8 , 743 (1973)
- 94 Robinson, J.D.:
Interactions between monovalent cations and the (Na+K) dependent adenosine triphosphatase.
Arch. Biochem. Biophys. 139 , 17 (1970)
- 95 Robinson, J.D.:
Cation interactions with different functional states of the Na-K-ATPase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 185 (1974)
- 96 Robinson, J.D.:
Functionally distinct classes of K- sites on the (Na+K) dependent ATPase.
Biochem. Biophys. Acta 384 , 250 (1975)
- 97 Robinson, J.W.L.:
The difference in sensitivity to cardiac steroids of the (Na-K)-stimulated ATPase and amino acid transport in the intestinal mucosa of the rat and other species.
J. Physiol. 206 , 41 (1970)

- 98 Rosenzweig, N.S.:
Diet and intestinal enzyme adaptation : implications for
gastrointestinal disorders.
Am. J. Clin. Nutr. 28 , 648 (1975)
- 99 Sargent, J.R., Thomson, A.J.:
The nature and properties of the inducible sodium-plus-
potassium-ion-dependent adenosine triphosphatase in the
gills of eels (*anguilla anguilla*) adapted to fresh water
and sea water.
Biochem. J. 144 , 69 (1974)
- 100 Schmidt, U., Dubach, U.C.:
Induction of NaK ATPase in the proximal and distal con-
volution of the rat nephron after uninephrectomy.
Pflügers Arch. 346 , 39 (1974)
- 101 Schmidt, U., Schmid, J., Schmid, H., Dubach, U.C.:
Sodium - and potassium activated ATPase : A possible
target of aldosterone.
J. Clin. Invest. 55 , 655 (1975)
- 102 Schön, R., Dittrich, F., Repke, K.R.H.:
Thermodynamic evaluation of flip-flop mechanism for
transport and ATP synthesis function of (NaK) ATPase.
Acta biol. med. germ. 33 , K 9 - K 16 (1974)
- 103 Schoner, W., v. Illberg, C., Kramer, R., Seubert, W.:
On the mechanism of Na- and K- stimulated hydrolysis of
adenosine triphosphate.
I. Purification and properties of a Na- and K- activated
ATPase from ox brain.
Europ. J. Biochem. 1 , 334 (1967)
- 104 Schultz, S.G., Frizell, R.A., Nellans, H.N.:
Ion transport by mammalian small intestine.
Ann. Rev. Physiol. 36 , 51 (1974)
- 105 Schwartz, A., Bachelard, H.S., Mc Ilwain, H.:
The sodium-stimulated adenosine-triphosphatase activity
and other properties of cerebral microsomal fractions and
subfractions.
Biochem. J. 84 , 626 (1962)

- 106 Silva, P., Hayslett, J.P., Epstein, F.H.:
The role of Na-K- activated adenosine triphosphatase in potassium adaptation.
J. Clin. Invest. 52 , 2665 (1973)
- 107 Silva, P., Charney, A.N., Epstein, F.H.:
Potassium adaptation and Na-K-ATPase activity in mucosa of colon.
Am. J. Physiol. 229 , 1576 (1975)
- 108 Simonetta, M., Faelli, A., Cremaschi, D., Gordon, H.A.:
Electrical resistance and ATPase levels in the cecal wall of germ free and conventional rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150 , 541 (1975)
- 109 Singer, S.J.:
The molecular organization of membranes.
Ann. Rev. Biochem. 43 , 805 (1975)
- 110 Skala, I., Konradova, V.:
Hypertrophy of the small intestine after its partial resection in the rat: ultrastructure of the intestinal epithelium.
Am. J. dig. Dis. 14 , 182 (1969)
- 111 Skou, J.Chr.:
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta 23 , 394 (1957)
- 112 Skou, J.Chr.:
Further investigation on a Mg and Na activated adenosine-triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na and K across the nerve membrane.
Biochim. biophys. Acta 42 , 6 (1960)
- 113 Skou, J.Chr.:
Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membranes.
Physiol. Rev. 45 , 596 (1965)
- 114 Skou, J.Chr.:
The relationship of the (Na+K)-activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membranes
Bioenergetics 4 , 203 (1972)

- 115 Skou, J.Chr.:
The (Na-K)-activated enzyme system and its relationship
to transport of sodium and potassium.
Quart. Rev. Biophys. 7 , 401 (1975)
- 116 Spilker, B., Gadsdon, D.R., Rutty, D.A.:
Alteration of Na-K-dependent ATPase activity and
inotropism by polyethylene glycol 300 in guinea-pig atria.
Biochem. Pharmacology 20 , 815 (1971)
- 117 Squires, R.F.:
On the interactions of Na, K, Mg, and ATP with the Na
plus K activated ATPase from rat brain.
Biochem. biophys. Res. Comm. 19 , 27 (1965)
- 118 Stein, W.D., Eilam, Y., Lieb, W.R.:
Active transport of cations across biological membranes.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 227 , 328 (1974)
- 119 Stirling, C.E.:
Radioautographic localization of the sodium pump sites
in rabbit intestine.
J. Cell. Biol. 23 , 704 (1972)
- 120 Stewart, D.J., Semple, E.W., Swart, G.T., Sen, A.K.:
Induction of the catalytic protein of (Na+K)-ATPase in
the salt gland of the duck.
Biochim. biophys. Acta 419 , 150 (1976)
- 121 Thompson, B.D., Edmonds, C.J.:
Aldosterone, sodium depletion and hyperhyroidism on the
ATPase activity of rat colonic epithelium.
J. Endocr. 62 , 489 (1974)
- 122 Tilson, M.D., Wright, H.K.:
Adaptation of functioning and by-passed segments of
ileum during compensatory hypertrophy of the gut.
Surgery 67 , 687 (1970)
- 123 Tilson, M.D. Wright, H.K.:
An adaptive change in ideal Na-K-ATPase activity after
jejunectomy or jejunal transposition.
Surgery 70 , 421 (1971)

- 124 Tilson, M.D., Phillips, S., Wright, H.K.:
An effect of desoxycorticosterone upon the ileum
stimulating compensatory hypertrophy of the gut.
Surgery 69 , 730 (1971)
- 125 Tilson, M.D.:
Regional distribution of sodium-potassium activated
adenosine triphosphatase in rat gastrointestinal tract.
Yale J. Biol. Med. 45 , 12 (1972)
- 126 Tobin, T., Akera, T., Brody, T.M.:
Studies on the two phosphoenzyme conformations of
Na+K ATPase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242 , 120 (1974)
- 127 Vates, J.R.T.S., Bonting, S.L., Oppelt, W.W.:
Na-K-activated adenosine triphosphatase formation of
cerebrospinal fluid in the cat.
Am. J. Physiol. 206 , 1165 (1964)
- 128 Wall, A.J., Middleton, W.R.J., Pearse, A.G.E., Booth, C.C.:
Intestinal mucosal hyperplasia following induced hyper-
thyroidism in the rat.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6 , 79 (1970)
- 129 Weinman, E.J., Renquist, K., Stroup, R., Kashgarian, M.,
Hayslett, J.P.:
Increased tubular reabsorption of sodium in compensatory
renal growth.
Am. J. Physiol. 224 , 565 (1973)
- 130 Weinstein, I.D., Shoemaker, D.P., Hersh, T., Wright, H.K.:
Enhanced intestinal absorption after small bowel
resection in man.
Arch. Surg. 99 , 560 (1969)
- 131 Weser, E., Hernandez, M.H.:
Studies of small bowel adaptation after intestinal
resection in the rat.
Gastroenterology 60 , 69 (1971)
- 132 Weser, E., Whittam, R., Wheeler, D.P.:
Transport across cell membranes.
Ann. Rev. Physiol. 32 , 21 (1970)

- 133 Whittam, R., Chipperfield, A.R.:
The reaction mechanism of the sodium pump.
Biochim. Biophys. Acta 415 , 149 (1975)
- 134 Wright, H.K., Cleveland, J.C., Tilson, M.D.,
Herskovic, T.:
Morphology and absorptive capacity of the ileum after
ileostomy in man.
Amer. J. Surg. 117 , 242 (1969)
- 135 Wright, H.K., Tilson, M.D.:
The short gut syndrome. Pathophysiology and treatment.
Current problems in surgery 1971, p 1.
Chicago: Year Book medical Publishers 1971

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. med. K. Loeschke für die freundliche Überlassung des Themas, für viele wertvolle Anregungen, Ratschläge und Diskussionen sowie für die kritische Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. med. R. Kinne vom Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. Main, danke ich für die Beratung bei der biochemischen Methodik.

Lebenslauf

Geboren am 17. September 1948 als Sohn des Braudirektors Heinrich Schifffl und seiner Ehefrau Anna, geb. Martin in Moosburg / Krs. Freising.

1954 erfolgte die Einschulung, 1959 der Übertritt in das Hans- Leinberger- Gymnasium in Landshut; dort im Juli 1968 Abitur.

Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig- Maximilian- Universität München im WS 1968/69; ärztliche Vorprüfung (WS 1970/71) und Staatsexamen (SS 1974) mit der Note " sehr gut".

Von August 1974- November 1974 Medizinalassistent an der Chir. Klinik des Klinikums re. d. Isar der TU München.

1.12. 1974 Eintritt in das Physiologische Institut der Univers. München als Verwalter einer wiss. Ass.- Stelle.

